139138

Année : 2000

50378 2000 244

n°2773

UNIVERSITE DE LILLE 1

PROJET DE THESE

Pour l'obtention



du titre de Docteur de l'université de Lille 1 Option : Génie Enzymatique, Bioconversion, Microbiologie

par

Luc CHOISNARD

Réduction de l'aptitude au feutrage des fibres de laine par traitements oxydatifs et protéolytique de surface.

Soutenance prévue le 18 octobre 2000

Préparée au laboratoire de technologie des substances Naturelles IUT A-Département de Génie biologique

Mme BIGAN_M.	Maître de Conférence (Université de Lille 1)	Examinateur
M. GUILLOCHON D.	Professeur (Université de Lille 1)	Directeur de Thèse
M. SOTTON M.	Docteur d'Etat, Ingénieur Physico-chimiste (Directeur de l'ITF)	Rapporteur
M. COMBES D.	Professeur (INSA, Toulouse)	Rapporteur
M. DHULSTER P.	Professeur (Université de Lille 1)	Examinateur
M. LEMAN B.	Ingénieur C.N.A.M (CHARGEURS WOOL)	Examinateur
M. MORCELLET M.	Professeur (Université de Lille 1)	Examinateur

REMERCIEMENTS

Ces travaux on été réalisés au sein du Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles. J'exprime ma plus vive reconnaissance à Monsieur Didier GUILLOCHON, Professeur à l'Université de Lille 1 qui m'a accueilli et dirigé pendant ces trois années. Son soutien permanent sur le plan humain, scientifique et technique m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie Monsieur SOTTON Directeur de L'Institut Français du Textile et Monsieur Didier COMBES Professeur à l'école d'ingénieur de L'INSA de Toulouse qui ont accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je remercie Madame Murielle BIGAN qui a accepté d'être membre du jury. Ces conseils et sa participation dans l'élaboration des plans d'expériences ont été pour moi une aide incontournable.

Je tiens à remercier Monsieur Bernard LEMAN, Ingénieur de formation, responsable qualité et R&D au sein du groupe CHARGEUR. Son enthousiasme, son dynamisme et ses compétences dans le domaine du textile ont permis l'aboutissement de ce projet. Je l'associe pleinement à ces travaux et suis donc très heureux qu'il ai accepté d'en être juge.

Ma gratitude va également à Monsieur Michel MORCELLET Professeur à Lille 1 qui a bien voulu prendre le temps de juger cette thèse.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur Christophe RIHOUET, Ingénieur à l'ITF de Villeneuve d'Ascq, qui a pris part a cette étude tant sur le plan expérimental qu'analytique. Monsieur Yves LEROY, Ingénieur de recherche, pour sa participation et ses conseils dans le domaine de la chromatographie en phase gaz. Monsieur Jean-Philippe TISSIER Ingénieur de recherche à l'INRA de Villeneuve d'Ascq qui à réalisé l'ensemble des observations en microscopie électronique à balayage. Enfin, Monsieur Pascal DHULSTER, Professeur à Lille 1, dont les conseils et la jovialité ont souvent été d'un grand secours.

Mes pensées vont également à l'ensemble des permanents et des étudiants du LTSN ainsi qu'au personnel de l'IUT de Génie Biologique pour leur accueil, leur gentillesse et leurs conseils. Mes pensées vont plus particulièrement à Madame Anne BAZUS, Madame Naima NEDJAR-ARROUME, Madame Dominique VERCAIGNE-MARKO, Madame Françoise, Monsieur Bertrand FERTIN, Monsieur François KRIER, Monsieur Pierre CHARET, Monsieur Patrick DELPLACE et enfin Monsieur Gérard DEFIVE qui s'est personnellement impliqué dans ces travaux.

Enfin, Je remercie Mlle Karine MONDON, mes parents et grand-parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé durant cette période.

SOMMAIRE

Abréviations Introduction

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rappels sur le procédé de peignage des fibres de laine dans l'industrie textile	8
2. Structure et composition de la fibre de laine	10
2.1. Structure fine de la fibre	10
2.1.1. La cuticule	12
2.1.1.1. L'épicuticule	14
2.1.1.2. L'exocuticule	15
2.1.1.3. L'endocuticule	15
2.1.2. Le cortex	15
2.1.2.1. Le ciment intermacrofibrilaire	16
2.1.2.2. Les macrofibrilles	16
2.1.3. Le complexe cellulo-membranaire	17
2.1.3.1. La couche δ	19
2.1.3.2. Les couches β	19
2.1.3.3. Les couches i	19
2.2. Composition chimique de la laine	20
2.2.1. Les protéines	20
2.2.1.1. Les protéines associées aux kératines	21
2.2.1.2. Les filaments intermédiaires de kératines	22
2.2.2. Les lipides	23
2.2.2.1. Les lipides non liés à la fibre de laine	23
2.2.2.2. Les lipides liés à la fibre de laine	23
3. Le feutrage de la laine	25
3.1. Définition	25
3.2. Mécanisme du feutrage	25
3.3. Solutions industrielles actuelles de lutte contre le feutrage	27
3.4. Quels traitements pour l'avenir ?	29
3.4.1. Les oxydations alternatives au chlore	29
3.4.1.1. Oxydation par procédé plasma	29
3.4.1.2. Oxydation par l'ozone	29
3.4.1.3. Oxydation par le peroxyde d'hydrogène	31
3.4.2. Les traitements enzymatiques	31
3.4.2.1. Rappels	32
3.4.2.2. Les subtilisines	33

MATERIELS ET METHODES

1. Les consommables	36
1.1. Produits chimiques	36
1.2. Les enzymes	36
2. Dosage de l'activité enzymatique des protéases	37
2.1. Méthode d'Anson	37
2.1.1. Préparation de l'hémoglobine dénaturée substrat	37
2.1.2. Gamme étalon de tyrosine	38
2.1.3. Mise en œuvre des protéases sur l'hémoglobine dénaturée	38
2.1.4. Expression des résultats	39

4 5

2.2. Mesure de l'activité enzymatique résiduelle sur les fibres traitées	40
2.5. Mesure de la sensionne des nores de fame trances par un agent oxydant à l'attaqu	5 · ·
	41
3. Oxydation des fibres de laine	41
3.1. Oxydation par le chlore	41
3.2. Oxydation par H_2O_2 en presence d'ions metalliques ou d'oxyde metallique	42
3.3. Oxydation par l'acide performique	42
3.4. Oxydation par l'ozone	42
4. Caracterisation des modifications par les outils de l'industrie lainière	43
4.1. Mesure de la blancheur et du degre de jaune des fibres de laine	43
4.2. Mesure du diametre et du pourcentage de fibres de diametre superieur à 30µm	44
4.3. Mesure de la résistance ou ténacité des fibres de laine	44
4.4. Mesure de l'aptitude au feutrage	45
4.5. Mesure de résistance au rétrécissement lors du lavage machine	46
4.6. Observations en microscopie électronique à balayage	47
5. Analyse des lipides de surface	48
5.1. Extraction des lipides non liés de manière covalente à la fibre	48
5.2. Extraction des lipides liés de manière covalente à la fibre	48
5.3. Dérivation des acides gras	50
5.3.1. Dérivation des acides gras en ester de méthyle	50
5.3.2. Dérivation des esters de méthyle en N-acyl pyrrolidides	50
5.4. Mesure quantitative de l'acide 18-methyleicosanoïque	50
6. Optimisations	51
6.1. Optimisation par plans d'expériences	52
6.1.1. Plan d'expériences sur l'oxydation par l'acide performique et hydrolyse	
enzymatique	52
6.1.2. Plan d'expériences sur l'oxydation par l'ozone et hydrolyse enzymatique	: 52
6.1.3. Test des modèles mathématiques	53
6.1.3.1. Test de la normalité des résidus	53
6.1.3.2. Test d'homogénéité du Khi-2	54
6.2. Optimisation par Simplex	54
6.2.1. Construction de la matrice d'expériences du Simplex de type l	54
6.2.2. Calcul du point de symétrie du point à éliminer	55
	56
RESULTATS	
1. Etude de l'hydrolyse enzymatique menagee des fibres de laine oxydees par le chlore	57
1.1. Caracterisation de la preparation enzymatique industrielle utilisee	57
1.2. Etude du traitement enzymatique par les proteases	59
1.2.1. Etudes preliminaires	59
1.2.2. Caracterisation des proprietes des fibres modifiees par les outils de	63
l'industrie lainiere	
1.2.3. Analyse d'un marqueur lipidique de surface	67
1.2.3.1. Analyse qualitative de l'acide 18-methyleicosanoique	67
1.2.3.2. Analyse quantitative de l'acide 18-methyleicosanoique	75
1.2.4. Mise en evidence de l'efficacité du traitement irretrecissable des fibres d	;
anne apres oxydation par le chlore puis proteolyse enzymatique	11
2. Recherches de pretraitements alternatifs à l'oxydation de fibres de laine par le chlore	80
2.1. Oxydation par le peroxyde d'hydrogene en presence de métaux ou d'oxydes	
metalliques	80
2.2. Oxydation par l'acide performique	84
2.5. Oxydation par Fozone	86
3. Optimisation de l'indroiyse enzymatique de fibres oxydées par l'acide performique ou l'ozo	ne 90

3.1. Oxydation par l'acide performique	90
3.1.1. Recherche des facteurs influents par la méthode des plans d'expériences 2 ^k	91
3.1.2. Optimisation du procédé par la méthode simplex	102
3.1.2.1. Principe	102
3.1.2.2. Optimisation de la ténacité et du feutrage des fibres traitées par	
l'acide performique	105
3.2. Oxydation par l'ozone	109
3.2.1. Recherche des facteurs influents par la méthode des plans d'expériences 2 ^k	109
3.2.2. Optimisation par plan d'expérience composite centré	113
4. Caractérisation de fibres de laine traitées par un procédé d'oxydation par l'ozone suivie d'une	119
hydrolyse enzymatique ménagée	
Conclusions et perspectives	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	128

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

- AOX : composé organo-halogéné ;
- CCM : complexe cellulo-membranaire ;
- CPG : chromatographie en phase gazeuse ;
- CPG-SM : chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse ;
- FI : filament intermédiaire ;
- h.r. : humidité relative ;
- ITF : Institut Textile de France ;
- KAP : protéines associées aux kératines ;
- MEA : acide 18-méthyleinécosanoïque ;
- TCA : acide trichloracétique ;
- U.A. : unité d'absorbance ;
- U.V. : ultra-violet ;
- X : matrice codée de variation des facteurs du plan d'expérience ;
- W : blancheur des fibres de laine ;
- Y : matrice des réponse du plan d'expérience ;
- Ø : diamètre ;
- %>30μm : pourcentage de fibres dont le diamètre est supérieur à 30μm ;
- $\Delta_{\rm Y}$: erreur expérimentale ;
- $\Delta_{\rm E}$: erreur sur l'effet.

INTRODUCTION

En 1998, le marché mondial de la laine peignée était de 547800 tonnes (49% Asie, 41% Europe et 10% autres). Sur cette production, environ 270000 tonnes ont été employées dans l'industrie textile de l'habillement. Pour ce type d'utilisation, les fibres doivent être rendues irrétrécissables pour pouvoir justifier du label « lavable machine » correspondant. Dans 90% des cas, le traitement est obtenu par application d'une résine à la surface des fibres préalablement oxydées par un dérivé chloré. La nature de ce procédé et les tonnages de matière impliqués sont à l'origine d'une pollution organochlorée importante de moins en moins tolérée sur le plan environnemental.

Dans ce cadre, l'objectif de l'étude proposée par CHARGEURS WOOL est de produire une fibre irrétrécissable par un traitement respectant l'environnement pouvant s'insérer dans le procédé continu d'obtention du ruban de laine. Par ailleurs, le flux de matières circulant dans la chaîne de production est d'environ 1 tonne par heure, cette étape ne doit pas excéder 10 minutes pour ne pas augmenter démesurément la taille de l'installation industrielle. Idéalement, le surcoût engendré par le procédé ne doit pas excéder 1\$/kg de laine, cette somme correspondant à celle du traitement irrétrécissable d'un kilogramme de fibres par un procédé classique à base de chlore.

Les enjeux commerciaux sous-tendant cette problématique motivent depuis de nombreuses années une recherche active. Ainsi, la structure externe des fibres désignée sous le terme de « cuticule » a été directement mise en cause dans les phénomènes de feutrage à l'origine du rétrécissement des étoffes de laine (Shorter, 1923 ; Martin, 1944). La cuticule constitue donc naturellement la cible privilégiée de la plupart des traitements irrétrécissables. De nombreux procédés d'oxydation alternatifs tentent aujourd'hui de concurrencer le procédé au chlore. Citons par exemple les traitements par les gaz plasma (Kan et coll., 1998), les oxydations par le peroxyde d'hydrogène en présence de divers catalyseurs métalliques ou par l'ozone (Bradlhey et Coll., 1993 ; Thorsen, 1980). Dans la plupart des cas, les limites de ces procédés sont soit leur durée, leur coût, leur difficulté de mise en œuvre ou encore leur faible efficacité imposant alors l'ajout supplémentaire de résine d'enrobage. Par ailleurs, l'innocuité environnementale de ces procédés n'a pas toujours été un objectif premier.

En parallèle, la nature essentiellement protéique des fibres kératinisées a orienté très tôt les chercheurs dans la direction des enzymes protéolytiques. Toutefois, le haut degré de polymérisation de la cuticule par des ponts disulfures rend cette structure très résistante aux attaques protéolytiques. Une étape de pré-traitement oxydatif capable de rompre ce type de liaison s'est donc rapidement imposée (Heine et Höcker, 1995). Trois procédés font aujourd'hui figure de référence dans ce domaine sans pour autant avoir trouvé un écho favorable sur le plan industriel :

le traitement « Chlorzyme » est une solution efficace mais utilisant la papaïne sur des fibres préalablement oxydées par le chlore. Cette solution est donc chère et non écologique (Moncrieff, 1953).

Le traitement « Perzyme » de Otten et Blankenburg (1962). Ce procédé présente l'avantage de remplacer le chlore par le peroxyde d'hydrogène mais reste onéreux en raison de sa durée et de l'utilisation de la papaïne.

Le traitement proposé par Dybdal et coll. (1996) met en œuvre la subtilisine, enzyme bon marché, sur une fibre préalablement oxydée par le peroxyde d'hydrogène en présence de catalyseurs métalliques ou par un plasma à l'oxygène.

A ce jour, l'obtention de fibres irrétrécissables par voie enzymatique reste une alternative écologique séduisante au procédé chimique pur. Ainsi, en accord avec CHARGEURS WOOL, le choix du biocatalyseur s'est arrêté sur un mélange de subtilisines industrielles peu spécifiques. Il apparaît clairement que l'attaque enzymatique ne saurait être efficace sans une étape préalable de prétraitement chimique. L'objectif de ces travaux est de définir la nature de ce prétraitement chimique ainsi que les modalités de sa mise en œuvre avant l'étape d'hydrolyse enzymatique. En plus des contraintes environnementales, le procédé irrétrécissable devra respecter d'une part les astreintes industrielles (coût, durée...) et d'autre part les qualités globales du produit obtenu (couleur, résistance, finesse...).

Dans un premier chapitre bibliographique, des rappels sur le procédé de peignage des fibres de laine recentrent la problématique dans son contexte industriel. L'étude détaillée de la structure et de la composition biochimique des fibres permettra de mieux comprendre l'origine et les conséquences du feutrage. Enfin, les solutions industrielles actuelles et les perspectives de lutte chimique et enzymatique contre le feutrage ont également été développées.

Ces travaux ont été articulés autour de trois axes successifs :

Après une étude concise de la préparation enzymatique, nous avons montré que la sensibilité des fibres de laine à l'hydrolyse dépendait de leur oxydation préalable par le chlore. Les modifications engendrées par ce traitement ont été analysées en détail selon deux angles distincts. Les modifications affectant les caractéristiques physiques observables par les outils spécifiques de l'industrie textile et celles plus fines affectant la présence d'un marqueur biochimique de la surface, le 18-méthyleicosanoate. L'efficacité de ce traitement, dans l'objectif initial d'irrétrécissabilité, a également été montrée.

Par la suite, différentes voies d'oxydation alternatives au chlorage ont été recherchées. Nos investigations se sont concentrées sur l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène en présence de divers catalyseurs métalliques, par l'acide performique et par l'ozone.

Enfin, parmi l'ensemble des solutions sondées, deux pistes ont été étudiées plus en détail : l'oxydation par l'acide performique et celle par l'ozone. La technique des plans d'expériences factoriels complets à deux niveaux puis l'optimisation par simplex de type 1 nous ont conduit à abandonner la voie d'oxydation par l'acide performique. Cette même technique des plans d'expériences factoriels complets à deux niveaux puis composite centré a démontré l'efficacité du traitement par l'ozone. Un test ultime de rétrécissement en machine d'une étoffe de laine tricotée à partir de fibres oxydées par l'ozone et attaquées par les subtilisines confirme finalement la faisabilité de ce procédé d'avenir.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Cette étude bibliographique a été subdivisée en trois parties. Dans un premier temps, la problématique a été recentrée dans son contexte industriel. Par la suite, la structure et la composition des fibres de laine ont été étudiées en détail. Enfin, à la lumière de ces éléments, le feutrage responsable du rétrécissement des étoffes de laine a également été défini et les solutions actuelles et futures de son éradication abordées.

1. Rappels sur le procédé de peignage des fibres de laine dans l'industrie textile

Les grandes étapes du peignage de la laine sont les suivantes :

 Nettoyage : les tonsures de mouton réceptionnées en balles de 170 à 400kg sont lavées pour éliminer le maximum de débris végétaux, de résidus terreux et de graisse qui peuvent constituer jusqu'à 40% du poids de matière brute (figure 1). Cette étape est réalisée par passage dans trois bains successifs à pH≈9 en présence d'un détergent industriel (*Valsol*).



Figure 1 : Photographie des balles de laine (\bigcirc) et des fibres de laine brute avant lavage (\bigcirc) .

• Séchage : les fibres sont essorées entre deux rouleaux jointifs de manière à éliminer un maximum d'eau de lavage. La matière transportée par des bandes porteuses traverse trois séchoirs en série diffusant de l'air chaud (80°C) dans la masse de fibre. Cette étape permet de réduire l'humidité relative des fibres de 50% après essorage à 2% à la sortie du dernier séchoir.

• Cardage : cette opération consiste à démêler, individualiser et paralléliser les fibres. Par ailleurs, l'étape élimine les dernières impuretés végétales encore présentes à l'issue du lavage et du séchage.

Peignage : la matière progresse à travers une série de peignes de plus en plus fins qui parallélisent de plus en plus les fibres et permettent d'éliminer les fibres courtes (blousse). A l'issue du peignage, les fibres de laine sont conditionnées sous forme de ruban uniforme (figure 2) pouvant subir ensuite des opérations classiques de transformation (filature, tissage, blanchiment, teinture, application d'apprêts...).



Figure 2 : Ultime étape de conditionnement des rubans de laine.

L'étape de traitement d'irrétrécissabilité des fibres pourrait être insérée dans ce procédé de peignage. Stratégiquement, il serait plus intéressant de localiser le traitement entre l'étape de lavage et de peignage. En effet, au cours de l'étape de peignage, le feutrage à l'origine du rétrécissement des fibres de laine est responsable d'une perte par cassage d'environ 10% de la matière. L'élimination du feutrage en amont de ce stade permettrait donc théoriquement de récupérer 10% de fibres.

2. Structure et composition de la fibre de laine

La fibre de laine, comme tout poil animal, est une sécrétion glandulaire issue de la peau. La croissance du poil est réalisée par prolifération des cellules du bulbe poussées à travers le follicule (figure 3).



Figure 3 : Implantation du poil de laine dans la peau (Collins et Davidson, 1997).

2.1 Structure fine de la fibre

La fibre de laine est un matériel composite issu de l'assemblage de trois composants histologiques mineures : la cuticule, le cortex et le complexe cellulo-membranaire (figure 4).



Figure 4 : Structure morphologique de la laine.

Les cellules de la cuticule [1] sont directement en contact avec le milieu extérieur et isolent ainsi le poil. Cette cuticule est constituée par trois couches (épicuticule [1.1], exocuticule [1.2], endocuticule [1.3]) qui recouvrent la totalité du cortex. Les deux types de cellules corticales, le paracortex [2.1] et l'orthocortex [2.2] ne sont pas disséminés de façon homogène dans le cortex mais répartis en deux groupes distincts sur toute la longueur du poil. Ces cellules, ainsi que la surface de la cuticule, sont recouvertes par le complexe cellulomembranaire [3.1]. Chaque cellule corticale est formée par le reste des constituants de la cellule initialement vivante [3.2] et par des macrofibrilles [4]. Les macrofibrilles sont constituées par l'assemblage de microfibrilles [5] emprisonnées dans une matrice interfilamentaire contenant des protéines associées à la kératine [4.1]. Les microfibrilles sont elles-mêmes issues de l'assemblage de dimères [6] de kératine [7].

Par ailleurs, un canal médullaire peut également être présent dans les laines grossières, il se compose de cellules creuses avec un squelette de protéines amorphes et de fins filaments (Clement et coll., 1988). Lorsque ce canal est présent, il est localisé dans la partie centrale de la fibre.

2.1.1. La cuticule

La cuticule constitue environ 10% (g/g) de la fibre kératinisée (Bradbury et King., 1967). Présente à la surface du poil où elle agit comme couche protectrice, elle est directement impliquée dans les phénomènes de feutrage (Moncrieff, 1953; Bradbury, 1960, 1961; Makinson, 1979).

Les cellules de la cuticule, légèrement courbées et rectangulaires sont souvent comparées aux tuiles d'un toit. Comme le montre la figure 5, cette structure est bien visible en microscopie électronique à balayage.



Figure 5 : Fibres de laine observées en microscopie électronique à balayage. L'extrémité de la cellule de cuticule est délimitée par une arrête saillante qui chevauche la cellule suivante (Klausen et coll., 1995).

Pour la laine de mérinos, Bradbury et Leeder décrivent en 1970 des cellules de dimensions relativement homogènes $30 \times 20 \times 0.6 \mu m$. Toutefois, des études plus récentes menées par Phan et coll. (1995) ont révélé une grande hétérogénéité au sein d'une même fibre. Ainsi les

cellules cuticulaires couvrant le coté orthocortical (39µm) de la fibre kératinisée seraient plus courtes que celles présentes du coté paracortical (60µm). Cette situation entraîne un chevauchement des cellules de cuticule de moins grande amplitude du coté orthocortical (20%) par rapport à celles du coté paracortical (33%). Cette équipe a également montré que si, de manière générale, une seule cellule de cuticule couvrait la face orthocorticale, 1,2 ou 3 cellules peuvent être superposées sur la face paracorticale. De plus, l'épaisseur des cellules de cuticule varie en fonction de leur localisation au niveau de la surface du poil de laine. Ainsi l'épaisseur de la cuticule mesurée de la racine du poil à son extrémité terminale passe de 80-100 à 500-600nm. De plus, les dimensions les plus faibles sont observées au niveau de la cellule de cuticule se trouvant directement en contact avec le cortex alors que les épaulements de cuticule constituant les arrêtes peuvent atteindre 800nm. Ces valeurs sont toutefois fortement influencées par de nombreux facteurs comme par exemple le taux d'humidité de la fibre (Huson et coll., 1995).

La structure de la cuticule a pu être étudiée en détail dès qu'il fut possible de l'isoler de la fibre. C'est Allwörden en 1916 qui y parviendra le premier à l'aide d'eau saturée en chlore.

La cuticule est constituée par l'assemblage de 3 couches superposées. De l'extérieur de la fibre vers le cortex on distingue : l'épicuticule, l'exocuticule (A et B) et l'endocuticule (figure 6).



CIMENT INTERCELLULAIRE (1% CYS)

Figure 6 : Représentation schématique de la structure de la cuticule de laine en coupe longitudinale (Leeder, 1986).

2.1.1.1. L'épicuticule

Il s'agit d'une membrane hydrophobe semi-perméable couvrant la surface externe de la cuticule. Cette structure parfois associée au complexe cellulo membranaire est essentiellement de nature protéique (\approx 75%) riche en soufre (\approx 12% de cystéine) et lipidique (\approx 5%) (Lofts et Truter, 1969 ; Bradbury, 1973).

L'épicuticule d'une épaisseur de 50 à 70Å est formée par la juxtaposition d'une couche basale de protéines liées de manière covalente à une couche lipidique d'environ 9Å appelée couche « F » (Ward et coll., 1993). Cette pellicule lipidique est constituée par une monocouche d'acides gras thioesterifiés sur les résidus de cystéine (Figure 7).



Figure 7: Représentation schématique de l'épicuticule en contact direct avec la couche A de l'exocuticule. Les acides gras (majoritairement l'acide 18-méthyleicosanoïque) de la couche « F » sont reliés de manière covalente aux cystéines de la matrice protéique par des liaisons thioesters (Negri et coll., 1993)

2.1.1.2. L'exocuticule

L'exocuticule constitue 64% (g/g) de l'écaille totale et 6,4% du poids total de la fibre (Bradbury et Ley, 1972). Elle est formée par la superposition de deux couches de nature différente :

- la couche « A » de 0,1µm d'épaisseur localisée sur la partie la plus externe de la fibre correspond à l'élément cuticulaire le plus riche en composés soufrés.
- la couche « B » en contact direct avec l'endocuticule.

2.1.1.3. L'endocuticule

Cette couche constitue, pour la laine de mérinos, 38% (g/g) de la cuticule totale et 3,6% du poids total de la fibre (Bradbury et Ley, 1972).

L'endocuticule correspond au vestige de cytoplasme et de constituants cellulaires des cellules de cuticules initialement vivantes (Birbeck et Mercer, 1957; Rogers 1959A; Peters et Bradbury, 1972). L'endocuticule est localisée entre l'exocuticule et le complexe cellulomembranaire (CCM) qui l'isole du cortex.

Contrairement à l'exocuticule, l'endocuticule peut être digérée par les enzymes protéolytiques (Birbeck et Mercer, 1957 ; Bradbury et Ley, 1972).

2.1.2. Le cortex

Le cortex représente 90% (g/g) de la fibre. Il se compose de cellules de 80-100µm de long pour 3-6µm de large. Les deux types de cellules qui définissent la nature dichotomique du cortex sont l'orthocortex et le paracortex (Kulkarni et coll., 1971). Les dimensions et proportions relatives de chaque type de cellule varient d'un type de laine à l'autre, mais l'orthocortex est souvent plus développé que le paracortex (figure 8). Par ailleurs, dans certaines fibres un mesocortex en proportion très minime peut également être observé (Brown et Onions, 1960).



Figure 8 : Coupe ultraminces transversale (à gauche) et longitudinale (à droite) d'une fibre de laine observée au microscope électronique à transmission. La cuticule correspondant à la partie la plus externe de la structure délimite la masse centrale constituée par l'orthocortex (gris claire) et le paracortex (gris foncé) (Phan et coll., 1995).

Les cellules corticales, délimitées par le CCM, sont constituées à 85% par des macrofibrilles réparties de manière homogène dans la cellule et solidarisées par un ciment intermacrofibrilaire (Bradbury, 1973).

La quantité de matériel intermacrofibrilaire est plus importante dans l'orthocortex que dans le paracortex. Ainsi, les macrofibrilles du paracortex sont bien plus compactées que celle de l'orthocortex (Rogers 1959B).

2.1.2.1. Le ciment intermacrofibrilaire

Ce ciment est constitué par les restes nucléaires et cytoplasmiques des cellules corticales initialement vivantes.

2.1.2.2. Les macrofibrilles

Les macrofibrilles sont des composés fibrillaires semi-cristalins correspondant au produit de kératinisation du kératinocyte. La cohésion longitudinale des cellules du cortex est assurée

par les macrofibrilles qui interpénètrent deux cellules adjacentes au niveau de la zone d'interdigitation (Zahn, 1996).

Les macrofibrilles résultent de l'assemblage de paquets de 500 à 600 microfibrilles semicristallines et d'une masse de protéines associées à la kératine, l'ensemble étant emprisonné dans une matrice. Les microfibrilles et les protéines associées aux kératines interagissent à l'intérieur de la macrofibrille soit par des ponts disulfures latéraux, soit sous forme d'inclusions (Wagner et coll., 1983 ; Steinert et Roop, 1988).

Par ailleurs, l'arrangement des microfibrilles et de la matrice est beaucoup plus régulier dans les cellules du paracortex que dans celles de l'orthocortex (Bradbury et Ley, 1972).

Les microfibrilles présentent un diamètre de 2 à 10μ m pour une longueur de 1 à 4mm. Elles sont constituées par 8 sous filaments (protofibrilles ou protofilaments) eux-mêmes constitués par une unité structurale à 4 chaînes contenant 2 dimères en position antiparallèle. Chaque dimère est constitué par l'arrangement parallèle d'une kératine I (acide) et d'une kératine II (neutre ou basique), toutes deux majoritairement α hélicoïdales et faiblement soufrées (Dowling et Sparrow, 1991).

La cuticule et le cortex sont les éléments majoritaires de la fibre de laine, un nouveau protagoniste, le complexe cellulo-membranaire joue également un rôle important en assurant la cohésion de l'ensemble de la structure.

2.1.3. Le complexe cellulo-membranaire

Le complexe cellulo-menbranaire (CCM) constitue une structure complexe entourant les diverses cellules du cortex et de la cuticule (épicuticule). En formant ainsi un réseau à travers la fibre, il joue un rôle important de cohésion de l'ensemble (figure 9).



Figure 9 : Illustration schématique des trois grandes structures observées dans la fibre de laine. Le CCM constitue un réseau qui solidarise les cellules cuticulaires et corticales (Leeder, 1986).

Ce complexe mesure environ 28nm d'épaisseur et correspond à 3,3% du poids total de la fibre dont 0,8% de lipide, 1,0% de protéine et 1,5% de membrane résistante (Bradbury, 1973). Cette structure est synthétisée au niveau des follicules de laine localisés dans l'épiderme. Le CCM résulte de l'assemblage de 2 membranes cytoplasmiques de cellules adjacentes initialement vivantes grâce à un ciment intercellulaire.

L'observation au microscope électronique à transmission montre que le CCM est constitué par l'association de 5 couches : deux couches lipidiques β séparées par une couche centrale intercellulaire δ , l'ensemble flanqué par deux couches intracellulaires i (figure 10) (Bryson et coll., 1995).



Figure 10 : Représentation schématique du complexe cellulo-membranaire cortical de la laine montrant les relations des différentes couches lipide/protéine. a = bande cytoplasmique de protéine

kératineuse, b = lamelle interne kératinisée de protéines fibreuses hydrophobes, c = couche de lipides modifiés avec les têtes polaires rattachées aux protéines fibreuses, d = lamelle extérieure, e = protéines globulaires du matériel intercellulaire, f = « zone de contact » (Bryson et coll., 1995).

<u>2.1.3.1. La couche δ</u>

Elle forme une structure tridimensionnelle se propageant dans toute la fibre. La couche δ peut être subdivisée en 5 sous-couches.

Deux sous-couches (d), localisées à la lisière de la couche δ , sont constituées par des protéines fibrillaires hélicoïdales hydrophobes. Ces sous-couches correspondent aux lamelles extérieures kératinisées des membranes cytoplasmiques originelles. Les 2 sous-couches (c) sont formées par l'assemblage de protéines globulaires pauvres en soufre. La sous-couche (f) se trouve au centre de la couche δ , elle constitue une « zone de contact » de protéines globulaires solubles liées notamment par des ponts disulfures.

2.1.3.2. Les couches β

Ces couches sont formées par les chaînes aliphatiques hydrophobes de la bicouche de lipides issus des membranes cytoplasmiques considérablement modifiées. Selon certains auteurs, cette couche serait toujours traversée par des protéines.

2.1.3.3. Les couches i

Elles sont localisées directement à la lisière du CCM. Deux sous-couches distinctes sont observables, la première (b) correspond aux lamelles internes des membranes cytoplasmiques dont la composition n'est pas différente de celle des sous couches (d). La deuxième souscouche (a) correspond au résidu cytoplasmique, elle est constituée par des protéines kératineuses.

2.2. Composition chimique de la laine

La laine anhydre contient 97% (g/g) de protéines, 2% (g/g) de lipides internes ou présents à la surface de la fibre et 1% (g/g) de sels minéraux et hydrates de carbone (Heine et Höcker, 1995).

2.2.1. Les protéines

La répartition des acides aminés dans les différentes structures de la fibre a été rapportée dans le tableau 1 :

<u>**Tableau 1**</u> : Répartition en % (moles/mole) des acides aminés de la laine de mérinos (Bradbury, 1973).

ACIDE	LAINE	CORTEX		CUTICULE			
AMINE	entière	ortho	para	entière	épi	exo	endo
alanine	5,3	5,6	5,4	5,8	4,6	6,4	6,7
arginine	6,8	6,8	6,5	4,3	4,3	4,8	5,0
ac. aspartique	6,4	6,7	6,3	3,5	5,8	2,1	7,4
citruline + ornithine	0,1	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0
ac. cysteique + $\frac{1}{2}$ cystéine	10,6	10,3	12,9	15,7	11,9	19,9	3,1
ac. glutamique	11,9	12,1	12,6	8,7	10,7	8,5	10,3
glycine	8,6	8,6	7,5	8,2	15,3	8,6	8,1
histidine	0,9	0,7	0,7	0,8	1,0	0,5	1,1
isoleucine	3,1	3,2	3,3	2,7	2,5	2,9	3,9
leucine	7,7	8,4	7,3	6,1	5,5	4,6	9,3
lysine	3,1	2,8	2,3	2,7	4,8	2,1	4,2
méthionine	0,5	0,4	0,4	0,3	0,0	0,2	0,8
phénylalanine	2,9	2,7	2,2	1,7	1,9	1,2	3,9
proline	5,9	6,3	7,0	10,5	5,8	12,3	8,9
sérine	10,2	10,2	10,5	14,3	13,6	11,8	_10,7
thréonine	6,5	6,1	7,0	4,4	3,6	3,9	5,5
tyrosine	4,0	3,4	2,4	2,8	2,1	2,0	3,6

Au delà de cette répartition en acides aminés, il faut également noter la présence de liaisons peptidiques rares pouvant apparaître entre la lysine et l'acide glutamique. Ainsi, des motifs de N^{ε}-(γ -glutamyl)lysine ont été isolés de la cuticule (endocuticule majoritairement) (Röper et coll., 1984).

A l'échelle des protéines, deux types de molécules sont distinguables : les filaments intermédiaires de kératine (type I et II) et les protéines associées aux kératines.

2.2.1.1. Les protéines associées aux kératines

Il s'agit de la matrice protéique englobant les différents filaments intermédiaires de kératine. La structure primaire des protéines associées aux kératines est aujourd'hui bien connue. Toutefois, leur structure tertiaire et supramoléculaire ainsi que la localisation exacte des ponts disulfures intracaténaires et extracaténaire restent encore inconnues (Zahn, 1996).

Dans les années 60, ces protéines ont été subdivisées en trois familles : les protéines riches en soufre (< 30% en moles de cystéine), les protéines ultra-riches en soufre (> 30% en moles de cystéine) et les protéines riches en glycine/tyrosine (35-60% en moles). Toutefois, les découvertes toujours croissantes de nouvelles protéines ayant singulièrement compliqués la nomenclature, nous utiliserons en plus de leur ancienne terminologie, celle mise au point par Powell et Coll., (1997). Ces auteurs définissent les protéines associées aux kératines par la terminologie KAP m.n ou la lettre « m » caractérise un numéro de famille ou une protéine unique et « n » un numéro de composant. Pour la laine de mouton, les protéines associées aux kératines aux kératines de mouton, les protéines associées aux kératines de mouton de famille ou une protéine unique et « n » un numéro de composant. Pour la laine de mouton, les protéines associées aux kératines de mouton de famille ou une protéine unique et « n » un numéro de composant. Pour la laine de mouton, les protéines associées aux kératines aux kératines de mouton de famille ou une protéine unique et « n » un numéro de composant. Pour la laine de mouton de famille ou une protéines associées aux kératines identifiées ont été rassemblées dans le tableau 2 :

terminologie de Powell et Rogers (1997)	ancienne nomenclature	nombre de protéines	nombre d'acides aminés	nature	% (moles/moles) de l'acide aminé dominant.
KAP1.1-KAP1.4	riche en soufre B2	4	151-181	neutre- basique	22% de Cys
KAP2.1-KAP2.12	riche en soufre BIIIA	≥7	130-132	basique	24% de Cys
KAP3.1-KAP3.4	riche en soufre BIIIB	4	94-97	neutre- basique	16% de Cys
KAP4.1, KAP4.2	-	2	211	basique	80% Cys, Pro, Arg, Thr, Ser
KAP5.1, KAP5.2, KAP5.4, KAP5.5	ultra riche en soufre	4	168-197	très basique	33% Cys, 27% Gly
KAP6.1-KAP6.2	type II riche en gly/tyr	2	≈ 80	basique	60% Gly, Tyr ; 11% Cys
KAP7	type I riche en gly/tyr C2	1	84	basique	35% Gly, Tyr ; 6% Cys
KAP8	type I riche en gly/tyr F	1	61	basique	40% Gly, Tyr ; 6% Cys
KAP10.1	ultra riche en soufre	1	294	très basique	< 1% Gly

Tableau 2 : Nature des protéines associées aux kératines.

Les protéines associées aux kératines sont réparties de manière très spécifique dans la fibre de laine. Ainsi, les protéines des familles KAP5 et 10 sont exprimées au niveau de la cuticule, ce qui explique la richesse de cette structure en cystéine. Les familles KAP1, 2 et 3 sont traduites dans l'ensemble du cortex, alors que les protéines de la famille KAP4 sont localisées spécifiquement dans le paracortex et celles de KAP6, 7 et 8 au niveau de l'orthocortex (Powell et Rogers, 1997).

2.2.1.2. Les filaments intermédiaires de kératine

Les filaments intermédiaires de kératine (FIs) constituent une super-famille de protéines de deux types appelées kératine de type I (acide) et kératine de type II (neutre ou basique). La structure globale de ces protéines est représentée figure 11 :



Figure 11 : Structure générale des dimères de type I-type II constituant les filaments intermédiaires de kératine. Les deux protéines sont constituées par des domaines terminaux non hélicoïdaux flanquant un domaine α -hélicoïdal (schématisé par des barre). Le domaine conservé central de 46nm de long est constitué par quatre segments en α -hélice (1A, 1B, 2A et 2B) interrompus par des régions non hélicoïdales joignantes (L1, L12 et L2). Les extrémités N-terminale et C-terminale non hélicoïdales sont relativement courtes (E1, V1, H1 et E2, V2, H2 respectivement). E constitue un domaine terminal, V une région à séquence variable et H un domaine présentant une très forte homologie de séquence entre les deux types de chaîne (Powell et Rogers, 1997).

Quatre FIs de kératine de type I ont été observés chez le mouton, deux d'entre eux ont entièrement été séquencés (K1.1 et K1.2). De même, quatre FIs de kératine de type II ont également été mis en évidence et leur séquence partiellement ou totalement déterminée (K2.9, K2.10, K2.11 et K2.12), (Powell et Rogers, 1997).

2.2.2. Les lipides

La laine directement prélevée sur l'animal est naturellement recouverte d'une pellicule de suint correspondant à une couche lipidique sécrétée au niveau des follicules pileux. Lors du traitement industriel de la laine, le suint est éliminé par une étape de lavage alcalin souvent très en amont dans le procédé. Abstraction faite de ces corps gras, la composition lipidique de la laine reste très complexe. Ainsi, sur le plan biochimique, Rivett, (1991) distinguent trois grandes composantes : les stérols (\approx 40%), les lipides polaires (\approx 30%) et les acides gras (\approx 25%). Sur le plan structural, les lipides sont répartis en deux catégories en fonction de leur localisation et de la nature des interactions qui les lient à la fibre. Ainsi, nous pouvons distinguer :

2.2.2.1. Les lipides non liés à la fibre de laine

Ces lipides ne créent pas d'interaction covalente avec la fibre mais forment des inclusions au niveau du CCM qui peuvent être facilement extraites par les solvants organiques. Il s'agit des stérols ($^{2}/_{3}$ de choléstérols, $^{1}/_{3}$ desmostérols), des lipides polaires (sulfate de cholestérol, céramide et glycosphingolipides) et des acides gras libres ou acide gras internes (acide oléique, palmitique et stéarique essentiellement) (Negri et coll., 1993).

2.2.2.2. Les lipides liés à la fibre de laine

Bien que l'existence de tels lipides ait été postulée dès les années 50, ils furent partiellement libérés et détectés pour la première fois en 1985 par Evans et coll. Cette équipe exposant la fibre de laine à du t-butoxyde de potassium en solution anhydre dans le t-butanol montra la présence majoritaire de 18-méthyleicosanoate. Un groupement méthyle en antépénultième position ramifie de façon inhabituelle cet acide gras (figure 12).



Figure 12 : Acide 18-méthyleicosanoïque.

Par la suite, de nombreux autres lipides liés à la laine ont été mis en évidence par des techniques complémentaires tels que l'hydrolyse alcaline par la soude en présence d'alcool (saponification) ou par traitement à l'eau chlorée en condition acide (Negri et coll., 1991, 1992; Evans et Lanczki, 1997). Ainsi, Wertz et Downing, (1988) classent en 5 catégories les lipides totaux de la laine : les alcools gras (trace-0,2 mg/g de fibre), le cholestérol (0,3 à 1,4mg/g), le sulfate de cholestérol (0,7 à 2,9mg/g), les céramides (0,6 à 1,4mg/g) et les acides gras (2,3 à 4,0mg/g). Dans le cas des acides gras liés, une liste complémentaire de composés est venue enrichir la présence du 18-méthyleicosanoate (tableau 3).

Tableau 3 : Composition en acides gras liés de façon covalente à la fibre de laine (Wertz et Downing, 1989).

ACIDES GRAS	% (g/g)
acide myristique (14:0)	0,6
acide pentadécanoïque (15:0)	0,3
acide palmitique (16:0)	17,3
acide palmitoléique(16:1)	1,9
acide heptadécanoïque (17:0)	1,0
acide 14-méthylhexadécanoïque (17:0ai)	4,6
acide stéarique (18:0)	10,2
acide oléique (18:1)	5,2
acide nonadécanoïque (19:0)	0,3
acide 16-méthyloctadécanoïque (19:0ai)	3,8
acide arachidique (20:0)	2,5
acide 18-méthyleicosanoïque (21:0ai)	47,6
autres	4,7

Ce type d'acides gras est en majorité localisé en surface de la fibre au niveau de la couche « F » de l'épicuticule. Ainsi, Peet et coll., (1992) estiment, par calcul, qu'un résidu d'acide aminé de l'épicuticule sur dix est lié à un acide gras ; ce qui implique la quasi-totalité des cystéines présentes sur cette structure. Par ailleurs, les interactions liant ces lipides à la fibre de laine sont essentiellement de type thioester ce qui explique qu'ils ne puissent être extraits par les solvants organiques. Leur importance est telle que la couche « F » conditionne en partie les propriétés hydrophobes de la cuticule (Kalkbrenner et coll., 1990).

3. Le feutrage de la laine

3.1. Définition

Seules les fibres kératinisées sont susceptibles d'induire un feutrage. En effet, ce phénomène est étroitement lié aux propriétés frictionnelles des fibres imposées par la présence de la cuticule. Le feutrage apparaît lorsqu'une masse de laine agitée dans l'eau est soumise à une certaine pression. Chaque fibre bouge préférentiellement dans une direction et contribue à l'enchevêtrement et à la compaction de l'ensemble de la structure. Le produit ainsi obtenu est un feutre. En association avec le feutrage, le changement habituellement non désiré survenant sur les pièces de tissus est un rétrécissement pouvant atteindre dans les cas extrêmes une amplitude de 50% de la taille initiale. De nombreuses théories permettant d'expliquer l'origine du feutrage ont été avancées.

3.2. Mécanisme du feutrage

Shorter propose en 1923 un mécanisme qui sera par la suite largement approfondi. La figure 13 permet d'illustrer les grandes étapes du feutrage aboutissant au rétrécissement des étoffes de laines.



Figure 13(a-d) : Illustration du mécanisme de feutrage proposé par Shorter (Markinson, 1979).

Au niveau du fragment de laine AB, deux types d'interaction avec des fibres voisines sont envisageables. Dans le cas du contact au noeud T, les contraintes entre les fibres sont si fortes qu'aucun mouvement de AB n'est possible dans cette région (enchevêtrement total). Par contre, au nœud P, les contraintes plus faibles n'entravent pas totalement le glissement de AB par rapport aux fibres voisines (enchevêtrement partiel).Pour des raisons d'encombrement stérique de la cuticule, le mouvement de AB par rapport à P n'est possible que dans le sens de la pointe vers la racine (B \rightarrow A). Ainsi, comme le montre la figure 13(a) et 13(b), sous l'effet de compression des fibres, le nœud P glisse de manière irréversible vers le nœud T qui est resté immobile. Cette translation aboutit à un retrait irréversible. Dans le cas de la figure 13(c) et 13(d) le mouvement AB dans le sens de la racine vers la pointe étant impossible, il n'y a pas de translation de P vers T. Ainsi, lorsque la contrainte cesse, la fibre (d) revient dans sa position initiale (c).

Cette théorie a été complétée par Martin en 1944. Pour cet auteur, le rétrécissement est obtenu lors de séries de compression et d'extension de la masse de fibres de laine. Comme dans le modèle de Shorter défini précédemment, le phénomène est uniquement observable dans les zones de contrainte partielle (figure 14, ①). Sous l'action de forces de compression, les fibres qui se plient rencontrent passivement les racines d'autre fibres. Dés lors, ces fibres qui s'interpénètrent finissent par s'accrocher les unes aux autres (②). L'extension de l'échantillon entraîne de manière irréversible les racines dans une mouvement de compaction aboutissant à un enchevêtrement total (③).



Figure 14(1-3) : Représentation schématique du mécanisme de feutrage postulé par Martin en 1944.

Les mécanismes sous-tendant le phénomène de feutrage restent complexes et ne sont aujourd'hui encore que très partiellement connus. Dans la plupart des cas, le feutrage est une modification non désirée. De nombreux procédés antifeutrants ont donc été recherchés par les industriels.

3.3. Solutions industrielles actuelles de lutte contre le feutrage

A ce jour, environ 90% des traitements contre le rétrécissement impliquent l'utilisation d'une forme de chlorage et l'application de résine. De nombreux procédés sont mis à la disposition des industriels (tableau 4).

<u>**Tableau 4**</u> : Quelques procédés contre le rétrécissement de la laine.

Nom commercial	Type de procédé
Basolan [®] DC	Chlorage acide contrôlé (dichloroisocyanurate de potassium, DCCA)
Dylan [®]	Chlorure de permanganate (Dylan Z) Acide permonosulfurique (Dylan XCS et Dylan XB) Acide permonosulfurique, DCCA (Dylan XB2)
Wurlan [®] (ou I.F.P)	Polymérisation interfaciale de nylon sur la surface de la fibre

Toutefois, l'application de ces procédés à l'échelle industrielle reste limitée par rapport au système chlorage/Hercosett 57[®] réalisé en deux étapes :

un prétraitement oxydant par chlorage gazeux (1-2% de Cl₂) en milieu acide suivi d'une neutralisation par un sulfite de sodium (Na₂S₂O₅ ou NaHSO₃ ou Na₂SO₃ ou Na₂S₂O₄). Cette étape permet d'oxyder les cystines en acide cystéique (figure 15A) et d'hydrolyser quelques liaisons peptidiques (figure 15B) :

$$R-S-S-R' \xrightarrow{\text{CHLORATION}} \xrightarrow{\text{NEUTRALISATION}} R-SO_3H + HO_3S-R'$$
(A)
$$R-CONH-R' + Cl_2 \rightarrow R-CONR'-Cl \xrightarrow{H_2O} R-COOH + H_2N-R'$$
(B)

Figure 15 : Oxydation des fibres de laine par le chlore.

 l'augmentation de la tension superficielle critique des fibres résultant du chlorage permet leur encapsulation par un polymère de polyamide-epichlorhydrine (Hercosett 57[®]) (Anderson et coll., 1971).

L'utilisation de ce type de technologie à l'échelle industrielle est soumise aux restrictions environnementales limitant le rejet des composés organohalogénés (AOX) dans les effluents. Ainsi, ces procédés étant condamnés à disparaître à plus ou moins longue échéance, une intense activité de recherche à été réalisée dans l'objectif de trouver de nouveaux procédés pouvant se substituer au chlorage.

3.4. Quels traitements pour l'avenir ?

3.4.1. Les oxydations alternatives au chlore

Ces recherches ont eu pour objectif principal de remplacer le chlore qui est la source principale d'organohalogéné. Ces oxydations constituent pour la plupart une 1^{ére} étape préalable avant l'encapsulation des fibres par un agent polymérisant de surface.

3.4.1.1. Oxydation par procédé plasma

L'application de traitement plasma sur les fibres consiste à soumettre la masse de laine à un champ électromagnétique dans un gaz (O_2 , N_2 ...) partiellement ionisé sous une pression appropriée. Ce procédé à faible consommation d'énergie ne donne lieu à aucun effluent toxique ou polluant. Toutefois, il nécessite l'installation d'un matériel complexe et onéreux ainsi que le conditionnement des fibres sous une forme parfaitement déshydratée. Par ailleurs, les traitements plasma ne sont pas suffisants pour obtenir à eux seuls le critère irrétrécissable "lavable machine" et nécessite souvent l'application complémentaire d'un polymère de surface (Kan et Coll., 1998).

3.4.1.2. Oxydation par l'ozone

Aujourd'hui, l'utilisation de l'ozone n'est plus limitée au retraitement des eaux polluées par les effluents industriels. Cette molécule est par exemple impliquée dans certains procédés de stockage agroalimentaire (oeufs, fromages, fruits...) ou de blanchiment des pâtes à papier. Son intérêt est triple :

 O₃ présente un potentiel d'oxydo-réduction très élevé de 2,07V (Schulte et coll., 1995). Par ailleurs, la décomposition de l'ozone dans l'eau conduit à l'obtention d'espèces radicalaire très réactives (figure 16).

$$O_{3} + OH^{-} \rightarrow HO_{2}^{\bullet} + O_{2}^{\bullet}$$

$$HO_{2}^{\bullet} \implies O_{2}^{\bullet} + H^{+} \qquad (pKa=4,8)$$

$$O_{2}^{\bullet} + O_{3} \rightarrow O_{3}^{\bullet} + O_{2}$$

$$O_{3}^{\bullet} + H^{+} \implies HO_{3}^{\bullet}$$

$$HO_{3}^{\bullet} \rightarrow OH^{\bullet} + O_{2}$$

$$OH^{\bullet} + O_{3} \implies HO_{4}^{\bullet}$$

$$HO_{4}^{\bullet} \rightarrow HO_{2}^{\bullet} + O_{2}$$

$$HO_{4}^{\bullet} + HO_{4}^{\bullet} \rightarrow H_{2}O_{2} + 2O_{3}$$

$$HO_{4}^{\bullet} + HO_{3}^{\bullet} \rightarrow H_{2}O_{2} + O_{3} + O_{2}$$

$$OH^{\bullet} + OH^{\bullet} \rightarrow H_{2}O_{2}$$

$$O_{2}^{\bullet} + OH^{\bullet} \rightarrow OH^{\bullet}O_{2}$$

Figure 16 : Mécanisme de décomposition de l'ozone dans l'eau (Nayme, 1997).

 La décomposition de l'ozone peut-être catalysée par de nombreux effecteurs (OH⁻, H₂O₂, TiO₃) ou par U.V. Dans ces cas, de nombreux radicaux libres et des peroxydes très réactifs vis à vis des matières organiques sont générés. Ainsi, en présence d'H₂O₂, la décomposition de l'ozone est particulièrement bien connue (figure 17).

$$OH^{-} + O_{3} \rightarrow O_{2}^{\bullet} + HO_{2}^{\bullet}$$

$$H_{2}O_{2} \implies H^{+} + HO_{2}^{-} \quad (pKa=11,6)$$

$$O_{3} + HOO^{\bullet} \rightarrow OH^{\bullet} + O_{2}^{\bullet} + O_{2}$$

$$O_{3} + O_{2}^{\bullet} \rightarrow O_{3}^{\bullet} + O_{2}$$

$$O_{3}^{\bullet} + H_{2}O \rightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} + O_{2}$$



• Le produit ultime de la décomposition de l'ozone est l'oxygène. Un procédé en accord avec des considérations écologique est donc parfaitement envisageable.

Bradlhey et coll., (1993) montrent l'efficacité du traitement de fibres déshydratées soumises à l'action de O_3 en présence d'U.V. Par spectroscopie photoélectronique à rayon X, l'oxydation d'environ 90% des ponts disulfures de la surface en acide sulfonique (-SO₃H) à été mesurée. Ce taux de conversion s'avère très supérieur au résultat obtenu par plasma O_2 ($\approx 30\%$) et du même ordre de grandeur que ceux d'un traitement classique par Cl₂ ($\approx 100\%$). De plus, dans son brevet, Thorsen a envisagé en 1980 l'utilisation de l'ozone en solution dans un traitement contre le rétrécissement de la laine. Le procédé mis en œuvre utilisant l'ozone solubilisé nécessite malheureusement des volumes de solution très importants pour traiter une faible quantité de fibre.

3.4.1.3. Oxydation par le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est une molécule oxydante (1,78V) utilisée couramment dans les procédés de blanchiment des fibres de laine (Schulte et coll., 1995). En 1894, Fenton observe pour la première fois l'action des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} sur le peroxyde d'hydrogène. Aujourd'hui bien connues, les principales réactions mises en jeu sont les suivantes (figure 18).

 $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^ Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + HOO^{\bullet} + H^+$

Figure 18 : Réaction de Fenton.

Les radicaux libres OH[•] et HOO[•] sont des molécules oxydantes très réactives vis à vis des substances organiques. Par ailleurs, l'utilisation de nombreux autres sels métalliques a été envisagée pour catalyser la décomposition du peroxyde d'hydrogène. Ainsi, Khan et Kasha génèrent en 1963 de l'oxygène singulé ${}^{1}O_{2}$ lors de l'oxydation du peroxyde d'hydrogène par les ions ClO⁻. Aubry (1985) propose une classification de ces sels fondée sur leur aptitude à décolorer le tetrapotassium ruben-2, 3, 8, 9-tetracarboxylate qui réagit avec l'oxygène singulé. Cet auteur montre ainsi qu'un rendement de décoloration supérieur à 70% est notamment obtenu en présence de Ca²⁺, MoO₄²⁻ (molybdate), WO₄²⁻ (thungstate) contre 0% dans le cas du réactif de Fenton (H₂O₂/Fe²⁺) qui ne génère que des espèces radicalaires.

3.4.2. Les traitements enzymatiques

Parallèlement à ces approches par voie chimique, la voie enzymatique de traitement irrétrécissable des fibres de laine a également été envisagée.

3.4.2.1. Rappels

Historiquement, une des plus anciennes applications des enzymes sur les fibres kératinisées remonte à 1910 avec le brevet déposé par Dyck pour nettoyer les fibres animales à l'aide de

pepsine en présence d'HCl. En 1925, Trotman suggère que l'altération des fibres de laines par les enzymes protéolytiques est similaire à l'action obtenue par ClO^- ou Cl_2 sur les écailles de cuticule (Moncrieff, 1953). Michaelis et coll., montrent en 1935 que l'action des enzymes sur la laine est nettement accélérée en présence d'agent réducteur des ponts disulfures inattaquables par les biocatalyseurs eux-mêmes.

La première tentative de traitement infeutrable de la laine par voie enzymatique est proposée en 1938 par Phillips et Middlebrook. Dans ce procédé mieux formalisé par un brevet déposé en 1943, la laine est traitée par la pepsine ou la papaïne en présence de bisulfite de sodium de manière à réduire les ponts disulfures stabilisant les fibres. Cependant, cette méthode longue et coûteuse ne permet pas d'obtenir une attaque enzymatique régulière de la laine. Par la suite, le procédé antifeutrant « Chlorzyme » propose d'appliquer la papaïne en présence de bisulfite de sodium sur une fibre traitée au préalable par du chlore gazeux (Moncrieff, 1953). Dans ce cas, l'action de l'enzyme se limite à la surface dégradée de la laine. Bien que l'attaque de la papaïne ainsi obtenue soit beaucoup plus homogène que précédemment, la durée globale de cette technique excède les 2 heures et induit une production importante d'organohalogéné.

Ce dernier point a été résolu par le procédé « Perzyme » de Otten et Blankenburg (1962). La laine préalablement incubée dans une solution alcaline de peroxyde d'hydrogène pendant une courte durée est traitée par la papaïne en présence de bisulfite de sodium. Cette méthode permet d'obtenir une hydrolyse homogène et le blanchiment des fibres (cité dans Moncrieff, 1953). Toutefois, cette méthode relativement écologique ne semble pas avoir été appliquée à l'échelle industrielle car coûteuse (papaïne, perte de fibres).

La majorité des procédés publiés par la suite utilise également une combinaison chimique d'oxydation ou de réduction des fibres et une attaque enzymatique avec dans quelques cas l'application finale d'une résine. Plus original, mais plus coûteux et de mise en œuvre laborieuse, King et coll. (1989) proposent l'utilisation d'isomérase (E.C. : 5.3.4.1) capable de réarranger les ponts disulfures de la laine en présence de NADH.

L'utilisation de la subtilisine sur des fibres de laine prétraitées par plasma O_2 ou par le peroxyde d'hydrogène en présence Na_2WO_4 a été brevetée par Dybdal et coll. en 1996. Ce procédé relativement écologique donne des résultats intéressants mais inadaptés aux cadences de production industrielle qui impliquent un traitement continu en milieu liquide ou humide incompatible avec les plasmas.

L'utilisation de subtilisine commerciale a fait l'objet de cette étude. Quelques rappels bibliographiques permettent de caractériser cette enzyme.

3.4.2.2. Les subtilisines

Les subtilisines (E.C. : 3.4.21.62.) appartiennent à la classe des protéases à sérine (E.C. : 3.4.21.) qui sont probablement les enzymes les plus étudiées dans le domaines des protéases. Les protéases à sérine ont été retrouvées dans l'ensemble du règne biologique, qu'il s'agisse de virus, de procaryotes ou d'eucaryotes, et sont ainsi réparties dans plus de 20 familles. Les études cristallographiques de plusieurs membres de la famille des subtilisines ont montré de nombreuses similitudes avec la triade catalytique observée dans le site actif des chymotrypsines. Ainsi, bien que l'ordre de la séquence des trois acides aminés impliqués (Asp/His/Ser) et que la structure tridimensionnelle des molécules soient différentes, le mécanisme général reste identique (Rawlings et Barett, 1994). L'hydrolyse catalysée par ce type de biocatalyseur repose sur l'attaque nucléophile de la liaison peptidique au niveau du carbonyle qui présente par résonance une forme ionique marquée (figure 19).



Figure 19 : Résonance de la fonction carbonyle.

Cette attaque très étudiée dans le cas de la chymotrypsine implique la sérine¹⁹⁵. Toutefois, le pKa d'ionisation des β -OH sériques étant de l'ordre de 13,7, la forme alkoxyde nucléophile (β -O') ne peut être présente en concentration élevée au pH légèrement alcalin de fonctionnement de l'enzyme (Walsh, 1979). Ainsi, un système de relais de charge entre la sérine¹⁹⁵, l'histidine⁵⁷ et l'acide aspartique¹⁰² permet d'augmenter le caractère nucléophile de la sérine par transfert de son hydrogène du β -OH sur l'histidine⁵⁷ (figure 20) :


Figure 20 : Système de relais de charge au sein de la triade catalytique du site actif de la chymotrypsine (Zeffren et Hall, 1973).

Le mécanisme d'hydrolyse protéique par la chymotrypsine est schématisé figure 21. Dans une première étape d'acylation, la sérine attaque le carbonyle de la liaison peptidique (①). L'ester qui en résulte correspond à un état de transition tétraédrique (sp^3) instable qui évolue rapidement vers un intermédiaire acyl-enzyme par relargage d'un produit (XH) correspondant au fragment peptidique du côté C-terminal de la liaison hydrolysée (②).

Dans la deuxième étape de déacylation, le carbonyle de l'intermédiaire acyl-enzyme (③) subit l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau. Le nouvel état de transition tétraédrique ainsi formé évolue rapidement en libérant l'enzyme initiale et le deuxième fragment (RCOOH) correspondant au peptide côté N-terminal de la liaison peptidique de départ (④).



Figure 21 : Représentation schématique du mécanisme catalytique hypothétique de la chymotrypsine (Zeffren et Hall, 1973).

Au niveau industriel, les subtilisines ont largement bénéficié des progrès apportés par le génie génétique en matière de mutagenèse dirigée. Par exemple, la subtilisine BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* est facilement inactivée par l'oxydation de la méthionine²²², mais en remplaçant ce résidu par une cystéine, l'enzyme est beaucoup plus stable et son activité catalytique de départ est augmentée de 50%.

MATERIELS ET METHODES

1. Les consommables

1.1. Produits chimiques

La liste des consommables utilisées au cours de cette étude est présentée dans le tableau 5 :

Tableau 5 : Liste des consommables, fournisseurs et références utilisés.

Produit	Fournisseur	Référence catalogue	
Acide chlorhydrique HCl (≈35%)	PROLABO	20248295	
Acide formique CH_2O_2 ($\geq 80\%$)	PROLABO	20315366	
Acide sulfurique H_2SO_4 ($\geq 95\%$)	PROLABO	20700323	
Acide trichloroacétique C ₂ HCl ₃ O ₂ (≥98%)	PROLABO	20734295	
BF ₃ /MeOH trifluorure de bore à 20% (v/v) dans le méthanol	MERCK	S-04263	
Chloroforme CH ₃ Cl (≥99,9%)	SDS	02437E21	
Chlorure de potassium KCl (≥99,5%)	PROLABO	26764298	
Dihydrogénophosphate de potasium KH ₂ PO ₄ (≥99%)	PROLABO	26936293	
Dihydroxyde de calcium Ca(OH) ₂ (≥95%)	SIGMA	C-5551	
Ester de méthyle de l'acide héneicosanoïque C ₂₂ H ₄₄ O ₂ (≥99%)	SIGMA	H-3265	
Ester de méthyle de l'acide nonadécanoïque C ₂₀ H ₄₀ O ₂ (≥98%)	SIGMA	N-5377	
Sulfate de fer FeSO ₄ , 7H ₂ O (\geq 99%)	PROLABO	24244232	
Hydrogène H ₂	AIR LIQUIDE	Qualité R	
Hémoglobine bovine	SIGMA	H-2625	
n-Heptane C ₇ H ₁₆ (99%)	SDS	0503716	
Dipotasium hydrogénophosphate K₂HPO₄ (≥96%)	PROLABO	26927292	
Laventin LNB	BASF	9951710	
Méthanol CH₄O (≥99,8%)	PROLABO	20865322	
Molybdate de sodium Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O (≥99,9%)	SIGMA	S-6646	
Azote N ₂	AIR LIQUIDE	Qualité R	
Oxygène O ₂	AIR LIQUIDE	Qualité R	
Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ($\approx 30\%$)	PROLABO	23612294	
Réactif de Folin	PROLABO	31360264	
Hydroxyde de sodium NaOH (≥98%)	PROLABO	28244295	
Tungstate de sodium Na ₂ WO ₄ , 2H ₂ O (100%)	SIGMA	S-0765	
Tyrosine $C_9H_{11}NO_3$ (\geq 99%)	SIGMA	T-8909	
Urée CH ₄ N ₂ O (≥99,9%)	PROLABO	28877292	
Valsol LTAN	ICI SURFACTAN COLOR		

1.2. Les enzymes

Trois préparations industrielles d'enzyme sont utilisées dans cette étude :

• Le *BACTOSOL WO* conditionné sous forme liquide est un mélange de lipases et de protéases du type des subtilisines (CLARIAN, Référence : 2900098) ;

- Le Maxacal 60000L conditionné sous forme liquide est constitué par des protéases de type subtilisine. Ce produit a malheureusement été retiré du marché pendant la période de cette étude (Genecor®);
- Le *GC 897* correspond au produit de remplacement du *Maxacal 60000L*. Cette préparation de formulation identique au *Maxacal 60000L* est environ 4 fois plus concentrée.

Deux types d'application ont été réalisés avec ces enzymes : une mesure de la sensibilité enzymatique des fibres de laine préalablement oxydées (*BACTOSOL WO* et *GC 897*) et le traitement irrétrécissable des fibres de laine (*GC 897* ou *Maxacal 60000L*).

2. Dosage de l'activité enzymatique des protéases

2.1. Méthode d'Anson

Une unité Anson correspond à la quantité d'enzyme qui provoque la libération par minute d'une quantité de produits solubles dans l'acide trichloracétique (TCA), donnant à 760nm une absorption avec le réactif de Folin équivalent à un milliéquivalent de tyrosine (ces produits solubles dans le TCA sont obtenus par hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine dans des conditions spécifiques).

L'activité protéolytique de l'enzyme est déterminée par hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée. L'hémoglobine non hydrolysée et l'enzyme sont précipitées par du TCA, les phénols (tyrosine et tryptophane) libérés lors de l'hydrolyse restent solubles et peuvent alors être oxydés par le réactif de Folin. Ce réactif est un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est alors réduit sous forme d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Ces composés donnent une coloration bleue présentant une absorbance maximum à 760nm.

2.1.1. Préparation de l'hémoglobine dénaturée substrat

L'hémoglobine dénaturée est stable 15 jours à 4°C. Ce protocole est très proche de celui proposé par Sarath et coll. (1989).

Dans un becher thermostaté à 25°C, solubiliser 57,7g d'urée dans 50ml d'eau distillée et ajouter 12ml de NaOH 1M. Introduire délicatement 3,2g d'hémoglobine lyophilisée et laisser incuber 45 minutes à 25°C. Baisser le pH de la solution par 15,8ml de KH₂PO₄ 1M et rajouter 24ml d'eau distillée. Cette préparation est centrifugée 15 minutes à 3000t/min et le surnageant ajusté à pH=7,5 par de l'HCl 1M. La solution finale de hémoglobine est de 2% (g/g), elle doit être stockée au moins 4h à 8°C avant d'être utilisée.

2.1.2. Gamme étalon de tyrosine

Cette gamme a été réalisée à partir d'une solution stock de tyrosine à 1mM (tableau 6).

<u>**Tableau 6**</u> : Gamme étalon de tyrosine.

Tube N°	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	
Solution stock 1mM (µl)	0	50	100	200	300	
HCl (0,2M) (ml)	1	0,950	0,900	0,800	0,700	
NaOH (0,5M) (ml)	2					
Réactif de Folin (dilué au 1/3) (ml)	0,6					
Incubation	8 minutes à température ambiante					
nmoles/tube	0	50	100	200	300	

L'absorbance de la gamme est mesurée à 760nm contre de l'eau distillée.

2.1.3. Mise en œuvre des protéases sur l'hémoglobine dénaturée

Pour obtenir une réponse comprise dans la gamme étalon, l'enzyme doit éventuellement être diluée dans du tampon phosphate 0,25M à pH=7,5. La mesure de l'activité est obtenue en réalisant un blanc et un essai (tableau 7).

<u>**Tableau**</u> 7 : Suite séquentielle des opérations de dosage de l'activité protéolytique des préparations enzymatiques.

Tube N°	Blanc	Essai			
Enzyme dilué (ml)	0,5	0,5			
Hémoglobine dénaturée (ml) à 25°C	-	1			
Incubation	10 minu	ites à 25°C			
Acide trichloracétique 0,3N (ml)	2,5	2,5			
Hémoglobine dénaturée (ml) à 25°C	1	-			
Incubation	20 minutes à 25°C				
Centrifugation	2×(4000 tours/min 15 minutes)				
	\bigvee				
NaOH (0,5M) (ml)	2	2			
Surnageant de centrifugation (ml)	1	1			
Réactif de Folin (dilué au 1/3) (ml)	0,6	0,6			
Incubation	8 minutes à température ambiante				

L'absorbance de l'essai et du blanc correspondant est mesurée à 760nm contre le T_0 de la gamme étalon.

2.1.4. Expression des résultats

L'absorbance réellement liée à l'activité enzymatique est : DO_{750} de Essai_n - DO_{750} de Blanc_n. En effet, la dénaturation de l'hémoglobine peut éventuellement libérer spontanément quelques tyrosines qui peuvent réagir avec le réactif de Folin. La gamme permet de calculer grâce à la droite de régression la quantité de tyrosine présente dans le tube.

L'activité spécifique des enzymes est obtenue finalement par la relation suivante :

Activité spécifique =
$$\frac{\left[(\text{nmoles de tyro sin e par tube}) \times \text{facteur de dilution} \times 4 \times 10^{-3}\right]}{\left[10 \text{ min utes} \times 0,5\right]}$$

L'activité spécifique est alors exprimée en µmoles de tyrosine.(ml d'enzyme)⁻¹.min⁻¹

Des échantillons de 1,00±0,05g de fibre chlorée sont introduits 5 minutes dans 100ml de tampon borate 0,5mM à pH=9,2 et à 55°C contenant 200µl de *GC 897/*l. Nous avons testé différents traitements dans l'objectif d'éliminer toute trace d'activité enzymatique résiduelle présente sur les fibres essorées à 25kg/cm² par un foulard *ERNST BENZ textilmaschinen Rünlang-Zünrich* :

- Rinçage simple par 3×1 litre d'eau ;
- Incubation 10 minutes dans une enceinte à 100°C ;
- Introduction 5 minutes dans 1 litre de solution d' H_2SO_4 à pH=4,0 et rinçage par 2×1 litre d'eau ;
- Introduction 5 minutes dans 1 litre de solution d' H_2SO_4 à pH=2,5 et rinçage par 2×1 litre d'eau ;
- Introduction 5 minutes dans 1 litre de solution d' H_2SO_4 à pH=1,9 et rinçage par 2×1 litre d'eau ;
- Introduction 2 minutes dans 1 litre de solution d'H₂SO₄ à pH=1,9 et rinçage par 2×1 litre d'eau.

Les échantillons sont de nouveau essorés puis placés dans 80ml de solution d'hémoglobine à 5% et à 25°C (*cf.* 2.1. 1.). Au bout de 10 minutes, 1,5ml du surnageant sont prélevés et placés dans 2,5ml d'acide trichloracétique à 5% (m/v). Les échantillons sont incubés 15 minutes à 25°C et filtrés (filtre en acétate de cellulose *AIT CHROMATO*, \emptyset =13mm, porosité 0,22µm). Les filtrats récupérés sont dosés par la méthode de Folin (*cf.* 2.1.3.) sans dilution.

Le résultat est exprimé par rapport à un échantillon de référence n'ayant pas subi d'étape de dénaturation enzymatique :

activité résiduelle (%) = $\frac{\text{activité de l' échantillon}}{\text{activité de la référence}} \times 100$

2.3. Mesure de la sensibilité des fibres de laine traitées par un agent oxydant à l'attaque enzymatique

Ce protocole est inspiré des travaux de Peters et Bradbury, (1972). 1,05±0,05g de fibres sèches sont introduites dans 100ml de tampon borate 0,25M à pH=9,0 et à 60°C. Après 5 minutes (t=0) de pré-incubation, 140µl de *BACTOSOL WO* et 10µl de GC 897 sont introduits dans le milieu réactionnel. A différents intervalles de temps, 2ml du surnageant réactionnel sont prélevés et introduits dans un tube à hémolyse contenant 0,5ml d'HCl 0,1M de manière à arrêter la réaction. Le contenu du tube est filtré (filtre en acétate de cellulose *AIT CHROMATO*, \emptyset = 13mm, porosité 0,22µm) et l'absorbance du filtrat est mesurée à 280nm avec un spectrophotomètre *PERKIN ELMER LAMBDA 3*. Les valeurs des absorbances obtenues sont corrigées par un facteur tenant compte de la dilution engendrée par l'arrêt de la réaction à l'acide ainsi que de l'évolution du volume réactionnel modifié par les prélèvements successifs. Le résultat est formalisé par la relation suivante :

Absorbance corrigée =
$$\frac{\text{Absorbance mesurée} \times 2,5 \times 100}{2 \times \text{Vr}}$$

avec Vr : volume réactionnel au moment du prélèvement.

Pour s'affranchir d'éventuels phénomènes d'autolyse des fibres, un témoin sans enzyme est réalisé en parallèle et soustrait à l'absorbance corrigée.

3. Oxydation des fibres de laine

3.1. Oxydation par le chlore

Cette opération à été réalisée par l'Institut Français du Textile de Villeneuve d'ascq.

300g de fibres de laine cardée, peignée sont introduites dans 6 litres de tampon acétate 0,1M à pH=4 et incubées 5 minutes à 20°C. 4% (v/v) de *Basolant DC* (chlorocyanurate à 62-64% de chlore actif) sont ajoutés puis la préparation est incubée 45 minutes à 20°C. Les radicaux libres formés sont neutralisés par réduction avec du métabisulfite de sodium 0,3% (m/v) à

20°C pendant 15 minutes. L'échantillon de fibres est rincé à l'eau distillée puis essoré à 25kg/cm² par un foulard *ERNST BENZ textilmaschinen Rünlang-Zünrich*.

3.2. Oxydation par H₂O₂ en présence d'ions métalliques ou d'oxydes métalliques

Les fibres de laine sont introduites délicatement dans la solution oxydante préparée extemporanément (H_2O_2 1M, catalyseur 0,27M et 5g/l d'agent mouillant *Laventin LNB*), avec un rapport de bain de 1/3 (g de laine / ml de solution oxydante). Les catalyseurs utilisés sont Na₂MoO₄, 2H₂O; Na₂WO₄, 2H₂O; Ca(OH)₂ et FeSO₄, 7H₂O. Après un temps d'application variable, la laine est rincée abondamment à l'eau du robinet puis à l'eau distillée. Les échantillons de fibres rincés à l'eau distillée et essorés à 25kg/cm² par un foulard *ERNST BENZ textilmaschinen Rünlang-Zünrich* sont séchés 24 heures à température ambiante.

3.3. Oxydation par l'acide performique

1 volume d'H₂O₂ à 30% (v/v) est introduit dans 4 volumes d'HCO₂H à 80%. Après une incubation de 2 heures à 25°C, la solution éventuellement diluée dans l'eau distillée est utilisée extemporanément sur les fibres de laine en respectant un rapport de bain de 1% (g de fibre / ml de solution oxydante). Après un temps d'application variable, la laine est rincée abondamment à l'eau du robinet puis à l'eau distillée. Les échantillons de fibres rincés à l'eau distillée et essorés à 25kg/cm² par un foulard *ERNST BENZ textilmaschinen Rünlang-Zünrich* sont séchés 24 heures à température ambiante.

3.4. Oxydation par l'ozone

L'ozone est généré par un ozoneur $Ozat-1A^{\ensuremath{\mathscr{B}}}$ (Ozonia) à partir d'oxygène pur à plus de 99%. La production nominale de l'appareil à un débit de 1Nm³/h est d'environ 86gO₃/h soit un rendement de production de 6% (g/g). La concentration exacte de l'ozone dans l'oxygène est mesurée par photométrie U.V. à 254nm par un analyseur en ligne *BMT 963* (Ozonia).

10,05±0,05g de laine sèche sont immergés dans 1 litre d'eau distillée contenant éventuellement du peroxyde d'hydrogène et/ou du NaOH. Après essorage, les fibres sont placées dans une enceinte close à travers laquelle circule un flux d'ozone (figure 22) :



<u>Figure 22</u> : Schéma du réacteur de traitement des fibres de laine séchées ou humides par l'ozone. Les fibres de laine sont placées sur la grille située dans le réacteur.

4. Caractérisation des traitements par les outils de l'industrie lainière

4.1. Mesure de la blancheur et du degré de jaune des fibres de laine

Les mesures ont été réalisées par la société Prouvost Lefevbre selon la norme IWTO 35-87(E) :

2,0g de laine sont équilibrés à $20\pm2^{\circ}$ C et à $65\pm2\%$ d'humidité relative. Les paramètres trichromatiques vert (X), jaune (Y) et ambre (Z) des fibres de laine sont mesurés par un colorimètre *ICI Digital colorimeter*. Cet appareil est préalablement étalonné par un échantillon blanc ou quasi-blanc, un corps noir et une céramique brillante crème recommandée par le constructeur.

Les résultats sont exprimés par le calcul du degré de blanc W (grandeur sans unité) en excellent accord avec le jugement visuel de la blancheur :

W =
$$\sqrt{(100 - 0.94 \text{ Y})^2 + (2.84 \text{ X} - 2.35 \text{ Z})^2}$$

La blancheur est exprimée dans une unité de grandeur qui doit être la plus faible possible pour se rapprocher du blanc absolu. Sur le marché, les variations maximales de ce paramètre oscillent entre 52 pour les fibres les moins blanches et 42 pour les plus blanches. De manière générale, le degré de jaune varie dans un domaine de valeurs comprises entre 11 pour les fibres les moins jaunes et 15 pour les plus jaunes.

4.2. Mesure du diamètre et du pourcentage de fibres de diamètre supérieur à 30µm

Les mesures ont été réalisées par la société Prouvost Lefevbre selon la norme IWTO 12-95 : Les échantillons de laine coupés en fragments de 1,8 à 2,0mm sont conditionnés 24 heures à $20\pm2^{\circ}$ C dans une atmosphère dont l'humidité relative est fixée à $65\pm2\%$. Les fragments de fibres sont dispersés dans une solution de propan-2-ol a 8% (v/v) dans l'eau. La suspension est transportée à travers une cellule de mesure positionnée sur le trajet d'un rayon de lumière laser. La réduction de l'intensité du rayon laser occasionnée par le passage d'un fragment de fibre isolé est mesurée par un détecteur. Le signal est analysé par un ordinateur utilisant des tables de calibrations. Le diamètre moyen (finesse) et le pourcentage de fibres dont le diamètre est supérieur à $30\mu m$ (%> $30\mu m$) sont alors directement calculés. Ce dernier paramètre est un bon indicateur de l'état général des échantillons de laine. En effet, seul les fibres éclatées présentent un diamètre supérieur à $30\mu m$. Ce pourcentage doit donc être le plus faible possible pour garantir l'intégrité des échantillons de fibres de laine.

4.3. Mesure de la résistance ou ténacité des fibres de laine

Cette opération a été réalisée par l'Institut Textile de France de Villeneuve d'ascq selon la norme IWTO 32-82(E) :

La ténacité fournit une mesure des propriétés physiques des fibres de laine. Cette méthode est utilisée dans l'industrie textile pour appréhender quantitativement les modifications et dommages éventuels pouvant apparaître lors de traitements de blanchiment, de teinture ou de résistance au rétrécissement. Les échantillons de fibres à tester sont conditionnés 24 heures dans une atmosphère standardisée : $20\pm2^{\circ}C$ et $65\pm2\%$ d'humidité relative. Les fibres parallélisées sont placées dans un système de pince mobile appliquant une pré-tension uniforme sur tout l'échantillon. Au cours du test, l'écartement des pinces entraîne la rupture du paquet de fibres.

La ténacité se définit comme le rapport de la force de rupture par la densité linéaire de l'échantillon :

Densité linéaire (tex) = $\frac{\text{Masse de l'échantillon (mg)}}{\text{Longeur de l'échantillon (mm)}} \times 10^3$ Ténacité (cN / tex) = $\frac{\text{Force de cassage (cN)}}{\text{Densité linéaire (tex)}}$

La ténacité normale d'une fibre de 21µm de diamètre varie de 8,5 à 10cN/Tex.

4.4. Mesure de l'aptitude au feutrage

Cette méthode répond à la norme IWTO : 20-69(F) :

1,000 \pm 0,005g de fibres pré-équilibrées 24h à 20 \pm 2°C et à 65 \pm 2% d'humidité relative est introduit dans 50ml de tampon phosphate 50mM à pH7 et placé dans un appareil imprimant un mouvement rotatif tridimensionnel à raison de 80 rotations par minute (*Aachner Filzertest*, *ROSIK*). L'agitation est maintenue 60 à 90 minutes jusqu'à obtention d'une boule de feutre dont le diamètre n'évolue plus. Après séchage à l'étuve (50°C, 5h), le diamètre moyen (d_m) de la boule est calculé à partir de 3 mesures réalisées à l'aide d'un pied à coulisse (figure 23) :



Figure 23 : La boule de feutre ne forme pas une sphère parfaite. Le diamètre moyen de la boule de feutre est obtenu par le calcul de la moyenne arithmétique des 3 mesures a, b et c.

La densité de la boule de feutrage δ est obtenue par la relation suivante :

$$\delta = \frac{\mathrm{m}}{\mathrm{V}} = \frac{\mathrm{(m \times 6)}}{\mathrm{(\pi \times d_{\mathrm{m}}^{3})}}$$

Avec : δ = densité de feutrage (g.cm⁻³) ;

m = masse de laine (g);

V = volume de la boule de feutre (cm³);

 d_m = diamètre moyen de la boule de feutre (cm).

Le feutrage évolue dans les gammes de valeur de 0,200-0,130g/cm³ pour les feutrage intenses, de 0,130-0,100g/cm³ pour les feutrages moyens et de 0,100-0,05g/cm³ pour les feutrages faibles. Les densités inférieures ou égale à 0,05g/cm³ n'étant obtenues que dans le cas de fibres parfaitement infeutrables, elles restent difficilement mesurables.

4.5. Mesure de résistance au rétrécissement lors du lavage machine

Cette opération à été réalisée par l'Institut Français du Textile de Villeneuve d'ascq selon la norme IWS TM31 :

Les faibles quantités de fibres traitées au laboratoire au cours de cette étude ne permettent pas d'obtenir des pièces de tissus dont les dimensions sont suffisantes pour réaliser normalement le test IWS TM31. L'aptitude au rétrécissement (ou retrait) appréciée sur des tricots de seulement 100 cm² ne peut donc être analysée qu'à titre d'estimation.

Les changements dimensionnels des échantillons ont été mesurés après un cycle de lavage 7A (étape de relaxation du tricot) suivi de 5 cycles de lavage 5A (étape de feutrage) et d'un séchage à plat. Le résultat est exprimé par calcul du pourcentage de changement d'aire du tricot de laine :

% de changement d'aire = Lo + La
$$-\left(\frac{\text{Lo} \times \text{La}}{100}\right)$$

Avec Lo : le pourcentage de changement de longeur du tricot, et La : le pourcentage de changement de largeur du tricot. Lo et La peuvent prendre une valeur positive ou négative selon la nature des changements observés (+ : relaxation, - : retrait). Le terme (Lo×La/100) correspond à un facteur correctif illustré figure 24 :



Figure 24 : Représentation schématique des modifications dimensionnelles du tricot de laine. Le facteur correctif (Lo×La/100) permet de ne tenir compte qu'une seule fois du retrait de l'aire grisée localisée dans une surface de retrait commune à Lo et La.

Dans le cadre des normes européennes, les limites maximales de retrait les plus drastiques sont appliquées aux articles textiles chaussants. Dans ce cas, le pourcentage de changement d'aire à l'issue d'un cycle 7A suivi de 5 cycles 5A ne doit pas excéder –8%. Cette valeur de retrait correspond donc à une limite inférieure à ne pas dépasser.

4.6. Observations en microscopie électronique à balayage

Ces observations ont été réalisées au Laboratoire de Génie des Procédés et Technologies Alimentaires de l'INRA de Villeneuve d'ascq. Le microscope électronique utilisé est un HITACHI *S-3000N*. Quelques fibres de laine sont écrasées sur un ruban adhésif double face collé sur un support métallique adapté au microscope. Avant observation, la préparation est recouverte d'une très fine couche homogène d'or par un appareil *SEM COATING SYSTEM* de chez BIORAD. Cette étape permet d'éviter des phénomènes électrostatiques pouvant perturber les observations.

5. Analyse des lipides de surface

5.1. Extraction des lipides non liés de manière covalente à la fibre

Les lipides contenus dans 5,0g de laine sont extraits avec un appareil de Soxlhet (Negri et coll., 1993 ; Folch et coll., 1957) :

- 5h par une solution de chloroforme/méthanol (250ml, 2:1 v/v)
- 4h par une solution de chloroforme/méthanol (250ml, 1:2 v/v)

La laine est alors rincée au méthanol de manière à éliminer toute trace de chloroforme (Evans et Lanczki, 1997).

5.2. Extraction des lipides liés de manière covalente à la fibre

Comme le montre la figure 25, la laine dégraissée précédemment est saponifiée (①) puis, une première extraction au chloroforme est réalisée dans une ampoule à décanter (②). La phase supérieure isolée est acidifiée de manière à protoner les fonctions carboxylates des acides gras. Une nouvelle extraction au chloroforme est alors réalisée (③). Les extraits chloroformiques rassemblés dans un grand ballon sont évaporés au rotavapor à 40°C sous pression réduite (④). Dans l'objectif de transférer les acides gras dans une fiole plus petite, tarée, les résidus gras sont resolubilisés de manière répétée dans un mélange chloroforme/méthanol (⑤). Les acides gras encore présents dans le grand ballon sont soumis à une solution acide en présence de KCl de manière à protoner leurs fonctions carboxylates et faciliter leur transfert dans un nouvelle fraction de chloroforme/méthanol qui est finalement combinée à celle obtenue précédemment (⑥). Ces phases organiques sont filtrées à travers un filtre en verre fritté avant d'être introduites dans la fiole plus petite puis le filtrat est évaporé

rotavapor sous pression réduite et la masse de lipide mesurée (⑦) (Wertz et Downing, 1988 ; Negri et Cornell, 1991).



Figure 25 : Saponification de la laine dégraissée au préalable par un appareil de Soxlhet.

Les acides gras ainsi isolés doivent être dérivés pour pouvoir être analysés par chromatographie en phase gazeuse.

5.3. Dérivation des acides gras

Deux techniques ont été utilisées au cours de ce travail : une dérivation sous forme d'ester de méthyle (Morrison et Smith, 1964) ainsi qu'une dérivation sous forme de N-acyl pyrrolidide (Barnathan et coll., 1996).

5.3.1. Dérivation des acides gras en ester de méthyle

La graisse (\approx 90mg de graisse/g de laine) est solubilisé par une solution de NaOH 0,5M dans du méthanol à 90% (v/v) en respectant le ratio 2/10 (ml/mg de graisse). L'échantillon est incubé 20 minutes à 80°C puis une solution de BF₃ à 20% (v/v) dans le Méthanol est ajouté en respectant le ratio 2,5/10 (ml/mg de graisse de départ). Après incubation 2 heures à 80°C l'échantillon est refroidi et les acides gras dérivée sont extrait par l'heptane (0,1ml d'heptane/mg de graisse de départ).

5.3.2. Dérivation des acides gras en N-acyl pyrrolidides

Introduire 1ml de solution de pyrrolidine/CH₃COOH (10/1, v/v) par ml d'acides gras dérivés au préalable sous forme d'ester de méthyle et incuber 2 heures à 85°C. Evaporer les résidus de pyrrolidine et d'acide acétique sous un flux d'azote et introduire 5ml d'heptane par mg de dérivés. Acidifier le milieu en ajoutant 10ml d'acide acétique à 5% (v/v) par mg de dérivés. Enfin, prélever la phase heptane inférieure et la laver par 5 volumes d'eau.

5.4. Mesure quantitative de l'acide 18-méthyleicosanoïque

L'analyse de la solution d'ester de méthyle obtenue précédemment est réalisée par chromatographie en phase gazeuse avec un appareil *SHIMADZU Gas Chromatograph GC-14B*. La détection est obtenue par un détecteur à ionisation de flamme alimenté par de l'hydrogène. Le gaz vecteur utilisé est de l'azote (2,5ml/min) de qualité ordinaire, la colonne

capillaire méthylsilliconée de nature apolaire est une QC3/BP1 (\emptyset =0,33mm, longueur 25m, épaisseur du film 0,5µm) (SGE).

L'injecteur et le détecteur sont réglés à 180°C. Le signal est traité par un SHIMADZU C-R6A CHROMATOPAC.

La température initiale est maintenue 4 minutes à 180°C puis augmentée à 240°C à raison de 4°C/minute et stabilisée 20 minutes à cette valeur.

Pour le dosage, l'acide nonadécanoïque est utilisé comme étalon interne. Par ailleurs, en absence de standard commercial de l'acide 18-méthyleicosanoïque, le facteur de réponse de l'acide héneicosanoïque a été utilisé pour la réalisation d'une gamme d'étalonnage (Negri et coll., 1993, Negri et coll., 1991).

6. Optimisations

Les plans d'expériences ont d'abord été utilisés en agronomie puis ce sont répandus dans de nombreux autres domaines techniques. Ces méthodes permettent d'aborder le problème d'organisation optimale des essais opératoires de façon à obtenir un maximum d'informations avec un minimum d'expériences. Dans cette étude, trois types d'investigations ont été entreprises :

• la technique des plans d'expériences factoriels à deux niveau 2^k. Cette méthode permet une recherche qualitative et quantitative de l'influence de différents facteurs X (température, durée...) et de leurs interactions sur un ensembles de réponses Y (feutrage, couleur...). Une modélisation mathématique polynomiale de degré 1 est réalisable dans l'hypothèse ou la variation de la réponses étudiée Y est linéaire par rapport a tous les facteurs X et à leurs interactions.

• La technique des plans d'expériences composites centré. Cette méthode est réalisée sur la base d'un plan d'expérience factoriel 2^k auquel est ajouté un ensemble d'expériences permettant l'obtention d'un modèle mathématique polynomiale de degré deux. Dans ce cas, un optimal théorique peut être calculé dans le domaine expérimental défini pour chaque facteur X.

• la technique du Simplex. Cette méthode recherche sans modélisation la valeur de chacun des facteurs X influant de façon à obtenir une valeur Y optimale.

6.1. Optimisation par plans d'expériences

Au cours de cette étude, deux plans d'expériences ont été réalisés. Un plan sur le traitement des fibres de laine par l'acide performique et hydrolyse enzymatique par le GC 897 et un plan sur le traitement des fibres de laine par l'ozone et hydrolyse enzymatique par le GC 897.

6.1.1. Plan d'expériences sur l'oxydation par l'acide performique et hydrolyse enzymatique

Une solution mère d'acide performique HCO₃H est préparée 2 heures avant utilisation en mélangeant 4 volumes d'acide formique HCO₂H 80% à 1 volume d'H₂O₂ 30%. 10,05±0,05g de laine cardée et peignée sont traités à chaque expérience par 1 litre de solution oxydante diluée. Un traitement supplémentaire de 5 minutes par 1 litre de solution enzymatique (*GC897* 0,2ml dans 1 litre de tampon borate 0,25M à pH=9,2) a par ailleurs été réalisé. La concentration finale d'HCO₃H (0,082 ou 0,82M), la température de la solution oxydante (10 ou 35°C), la durée de ce traitement (5 ou 15min) et la température d'application de l'enzyme (35 ou 55°C) sont des paramètres fixés par la matrice d'expériences.

6.1.2. Plan d'expériences sur l'oxydation par l'ozone et hydrolyse enzymatique

Chaque expérience du plan a été réalisée sur des échantillons de $10,05\pm0,05g$ de fibres de laine cardée et peignée. Les échantillons sont immergés 10 minutes dans 1 litre d'eau distillée contenant selon les expériences 0,25M d'H₂O₂ et/ou 4mM de NaOH. Les fibres sont récupérées, placées sous une presse d'essorage à environ $25kg/cm^2$ (*ERNST BENZ textilmaschinen Rünlang-Zünrich*) et le ruban est dispersé fibre à fibre pour faciliter le passage du gaz oxydant à travers la masse de l'échantillon. Un traitement oxydant de 5 minutes par l'ozone a été réalisé dans le montage décrit précédemment (21/min ; 30-100g O₃/m³ ; pression du réacteur : 2 bars). Le traitement enzymatique est effectué pendant 5 minutes par 1 litre de tampon borate 0,25M à pH=9,2 et à 55°C contenant 200µl de *Valsol* et 0 à 180µl de *GC* 897. Les protéases sont dénaturées 2 minutes en immergeant les fibres dans 1 litre de solution d'H₂SO₄ 0,2% (v/v). Après rinçage (3×1 litre d'eau distillée), les échantillons sont séchés 24h à température ambiante.

6.1.3. Tests statistiques des modèles mathématiques

Deux tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel informatique *Modde 4.0* (SIGMA). Ce programme calcule un coefficient de régression linéaire r^2 et le coefficient d'homogénéité entre le modèle et la réalité expérimentale par la méthode du Khi-2.

6.1.3.1. Test de la normalité des résidus

Pour vérifier le modèle, la différence ou résidu entre le résultat expérimental et théorique est calculée pour chaque expérience u :

 $Res_u = mesure expérimentale Y_u - valeur théorique \eta_u$

Les résidus sont classés par ordre croissant et la fréquence cumulée de chaque résidu est calculée :

 $Freq_i = \frac{nombre de résidus \le Rés_i}{nombre d'expèriences}$

Puis, la probabilité d'appartenance à la loi normale N(0,100) est recherchée dans une table pour chaque fréquence cumulée. La courbe des probabilités de Fréq_u=f(Rés_u) est tracée dans un repère semi-normal. Ce graphique est linéaire si les résidus suivent une loi normale. Le modèle peut donc être caractérisé par le coefficient de régression linéaire r² calculé par la méthode des moindres carrés, la valeur de ce coefficient devant être la plus proche possible de |1|.

6.2.2. Test d'homogénéité du Khi-2

Ce test permet de comparer l'homogénéité entre les valeurs théoriques calculées à partir du modèle et les valeurs expérimentales. Le Khi-2 ou χ^2 est défini de la manière suivante (équation 12) :

Équation 12 : calcul du Khi-2.

$$\chi^2 = \sum_{u=1}^n \frac{(Y_u - \eta_u)^2}{\eta_u}$$

Avec n : le nombre d'expériences, Y_u la réponse mesurée à la u^{ème} expérience, η_u la réponse calculée à la u^{ème} expérience.

La probabilité d'adéquation du modèle avec les résultats expérimentaux est recherchée dans une table de Khi-2 tenant compte à la fois du degré de liberté du système et de la valeur du χ^2 calculée précédemment. Plus cette probabilité sera proche de 1, plus le modèle mathématique sera proche de la réalité.

6.2. Optimisation par Simplex

La méthode du Simplex, très souple d'utilisation, permet de s'approcher rapidement de l'optimum en éliminant successivement les essais dont les réponses sont les plus mauvaises (Delacroix et Porte, 1996A, 1996B).

6.2.1. Construction de la matrice d'expériences du Simplex de type 1

Le démarrage du Simplex est réalisé par une série d'expériences dont l'amplitude dépend du nombre k de facteur X (température, durée...) à optimiser.

Dans le cas des Simplex de type 1 appliqués à k facteurs ($k \ge 2$), la matrice d'expériences sous forme codée est imposée (tableau 8).

expérience n°	X ₁	X ₂	X ₃	 X _{k-1}	X _k
1	0	0	0	 0	0
2	A	В	В	 B	В
3	В	A	В	 В	В
4	В	В	A	 В	В
k	В	В	В	 A	В
k+1	В	В	В	 B	A

Tableau 8 : Matrice d'expériences d'un Simplex de type 1 pour k facteurs X.

Où A et B sont des fonctions du nombre de facteurs à optimiser. Les valeur de A et B peuvent être calculées par les formules suivantes :

$$A = \pm \frac{1}{\left(k\sqrt{2}\right)} \left(\sqrt{k+1} + k - 1\right) \qquad B = \pm \frac{1}{\left(k\sqrt{2}\right)} \left(\sqrt{k+1} - 1\right)$$

Avec : k est le nombre de facteurs optimisés.

Pour réaliser les expériences correspondantes, il est nécessaire de décoder la matrice. Cette opération est réalisée en appliquant la formule suivante :

$$U_i^{\exp u} = U_i^{\exp 0} + \operatorname{Pas}_i \times X_i^{\exp u} \tag{1}$$

Avec : $U_i^{exp u}$ le niveau réel du facteur i à l'expérience u, $U_i^{exp 0}$ le niveau initiale des facteur i à la première expérience, $X_i^{exp u}$ la valeur codé du facteur i à l'expérience u et Pas_i le pas de progression du Simplex.

La matrice d'expérience décodée pour k facteur est reportée dans le tableau 9 :

expérience n°	U ₁	U ₂	U ₃	 U _{k-1}	U _k
Exp 1	$U_1^{exp 0}$	$U_2^{exp 0}$	$U_3^{exp 0}$	 $U_{k-1}^{exp 0}$	U _k ^{exp 0}
Exp 2	$U_1^{exp 0} + Pas_1 \times A$	$U_2^{exp 0} + Pas_2 \times B$	$U_3^{exp 0} + Pas_3 \times B$	 $U_{k-1}^{exp 0} + Pas_{k-1} \times B$	$U_k^{exp 0} + Pas_k \times B$
Exp 3	$U_1^{exp 0} + Pas_i \times B$	$U_2^{exp 0} + Pas_2 \times A$	$U_3^{exp 0} + Pas_3 \times B$	 $U_{k-1}^{exp 0} + Pas_{k-1} \times B$	$U_k^{exp 0} + Pas_k \times B$
Exp 4	$U_1^{exp 0} + Pas_1 \times B$	$U_2^{exp 0} + Pas_2 \times B$	$U_3^{exp 0} + Pas_3 \times A$	 $U_{k-1}^{exp 0} + Pas_{k-1} \times B$	$U_k^{exp 0} + Pas_k \times B$
Exp k	$U_1^{exp 0} + Pas_1 \times B$	$U_2^{exp 0} + Pas_2 \times B$	$U_3^{exp 0} + Pas_3 \times B$	 $U_{k-1}^{exp 0} + Pas_{k-1} \times A$	$U_k^{exp 0} + Pas_k \times B$
Exp k+1	$U_1^{exp 0} + Pas_1 \times B$	$U_2^{exp 0} + Pas_2 \times B$	$U_3^{exp 0} + Pas_3 \times B$	 $U_{k-1}^{exp 0} + Pas_{k-1} \times B$	$U_k^{exp 0} + Pas_k \times A$

<u>Tableau 9</u> : Décodage de la matrice d'expériences pour k facteurs X d'après l'équation (1).

A l'issue de ce 1^{er} Simplex, les conditions opératoires d'une nouvelle expérience doivent être calculées.

6.2.2. Calcul des coordonnées du point de symétrie du point à éliminer

La progression du Simplex est obtenue en éliminant le plus mauvais point et en le remplaçant par un nouvel essai U_i^P qui correspond au symétrique de ce plus mauvais point U_i^M par rapport au centre de gravité des points restants U_i^J (isobarycentre). Les coordonnées sont calculées par la relation suivante (Bals et coll., 1996) :

$$\mathbf{U}_{i}^{P} = \frac{2}{k} \left(\sum_{J=1, j \neq P}^{k+1} \mathbf{U}_{i}^{J} - \mathbf{U}_{i}^{M} \right)$$

Avec M la plus mauvaise expérience du Simplex, P le point de remplacement de M, et J les k meilleures expériences.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Etude de l'hydrolyse enzymatique ménagée des fibres de laine oxydées par le chlore

Dans un premier temps, nous avons vérifié les caractéristiques enzymatiques des subtilisines de la préparation industrielle *GC 897*. Puis, dans un deuxième temps, l'hydrolyse appliquée aux fibres de laine a été étudiée plus en détail.

1.1. Caractérisation de la préparation enzymatique industrielle utilisée

L'objectif de cette étude est de vérifier la compatibilité des subtilisines de la préparation de GC 897 avec une étape de traitement s'insérant dans le procédé de lavage de la laine tel qu'il est pratiqué en usine. Idéalement, ce procédé doit être localisé après l'étape de lavage et avant l'étape de cardage dans la chaîne d'opérations de lavage, séchage, cardage et peignage des fibres de laine. Il est donc nécessaire d'étudier l'influence des conditions physico-chimiques observée dans les bac de lavage (pH≈9, Température ≈60°C) sur les performances des enzymes du GC 897.

L'activité spécifique du *GC 897* mesurée par la méthode d'Anson est de 1043µmoles de tyrosine libérées par ml de solution enzymatique et par minute. Comme le montre la figure 26, cette activité spécifique est peu sensible au pH des solutions d'hémoglobine substrat pour des valeurs comprises entre 7 et 10.



Figure 26 : Effet du pH sur l'activité spécifique du GC 897 à 25°C.

Ce résultat est important car il montre la compatibilité du GC 897 avec un procédé appliqué aux fibres issues des bacs de lavage à pH≈9.

L'influence de la température sur l'enzyme a également été étudiée. L'activité spécifique du *GC 897* a été déterminée par une méthode dérivée du dosage classique d'Anson. Ainsi, la solution substrat d'hémoglobine à 5% utilisée n'a pas été dénaturée par l'urée mais par la chaleur. En effet, si la présence d'urée n'affecte pas l'activité enzymatique à 25°C, celle-ci risquait d'être fortement altérée à des températures plus élevées. Dans cette éventualité, une chute d'activité n'aurait pu être attribuée exclusivement au phénomène de dénaturation thermique de l'enzyme.

Il a été choisi de dénaturer l'hémoglobine par un traitement de 10 minutes à 80°C. Cette précaution a permis d'éviter que des précipitations ne surviennent lors des expériences réalisées entre 70 et 85°C, ce qui aurait posé des problèmes d'interprétation des résultats entre 25 et 70°C et entre 70 et 85°C. Ainsi, toutes les activités spécifiques ont été obtenues en phase hétérogène avec une hémoglobine précipitée quelle que soit la température étudiée (figure 27) :



<u>Figure 27</u> : Evolution de l'activité spécifique de la préparation protéolytique de *GC 897* en fonction de la température.

Cette courbe montre que l'activité protéolytique du *GC 897* est maximale entre 60 et 70°C. Cette caractéristique bien que pouvant être nuancée par la dilution de l'enzyme montre que l'optimum d'activité spécifique est obtenu à la même température que celle des fibres en sortie des bacs de lavage à 60°C.

Le domaine d'activité des protéases du *GC 897* est donc compatible avec le domaine de température et le pH du procédé de traitement irrétrécissable positionné après l'étape de lavage des fibres dans la chaîne de production industrielle de laine peignée. Cette vérification ayant été réalisée, l'étude de l'application du *GC 897* sur les fibres de laine peut être envisagée.

1.2. Etude du traitement des fibres de laine par les protéases

L'étude bibliographique montre que l'application des enzymes sur les fibres kératinisées devait être précédée d'un traitement oxydant. Une étude préliminaire dans ce sens a donc été entreprise.

1.2.1. Etudes préliminaires

Dans un premier temps, l'attaque enzymatique de la laine a été réalisée sur des lots de fibres brutes ou prétraitées par une oxydation au chlore. Ce prétraitement présente l'avantage d'être un procédé éprouvé et pratiqué en routine dans l'usine du PEIGNAGE AMEDEE ; une quantité importante de laine oxydée à donc été obtenue rapidement. Par ailleurs, l'attaque enzymatique de ce type de fibre a déjà été réalisée avec succès (Moncrieff, 1953). Ce prétraitement au chlore permet d'obtenir un lot de fibres hydrolysables par les subtilisines dont les caractéristiques peuvent être interprétées à la manière d'un témoin d'hydrolyse positif par rapport à un lot de fibres de laine brute non prétraité. Ces échantillons permettent en outre de tester différentes procédures de mesure directe et d'évaluation finale de l'efficacité de l'étape d'hydrolyse enzymatique.

Idéalement localisées avant l'étape de peignage proprement dite, l'oxydation et l'attaque enzymatique des fibres doivent être réalisées sur une fibre lavée d'aspect très hétérogène. Dans le cadre de l'étude, nous avons décidé de simplifier le problème en travaillant sur un lot de fibres lavées, cardées et peignées dont l'homogénéité est plus importante.

En premier lieu, nous avons déterminé la sensibilité des fibres à l'attaque protéolytique en suivant dans le milieu réactionnel l'apparition des peptides issus de l'hydrolyse des protéines (Peters et Bradbury, 1972). La figure 28 montre l'évolution de l'absorbance à 280nm du surnageant du milieu réactionnel au cours de l'hydrolyse. Pour un échantillon de laine donné, les valeurs reportées sur le graphique correspondent à la différence entre les mesures obtenues en présence et en absence de la préparation enzymatique. Cette représentation permet de ne pas prendre en compte le relargage de peptides qui ne serait pas lié directement à l'action des protéases. De plus, un témoin ne contenant pas de laine a été réalisé pour s'assurer qu'il n'y avait pas d'évolution importante de l'absorbance due uniquement à la présence de la préparation enzymatique.



Figure 28 : Evolution de l'absorbance à 280nm du surnageant réactionnel d'hydrolyse d'une laine préalablement oxydée par le chlore ou non. Un témoin ne contenant pas de laine a par ailleurs été

réalisé. Masse de laine : $10,05\pm0,05g$; GC 897 : 10μ l ; BACTOSOL WO : 140μ L ; Valsol : 200μ l ; 1 litre de Tampon borate 25mM à pH=9,2 et à 60°C.

Cette courbe montre clairement l'effet positif du prétraitement oxydatif par le chlore vis à vis de la sensibilité des fibres à l'attaque enzymatique. L'absorbance à 280nm des peptides issus de l'hydrolyse de la laine brute est en effet très inférieure à celle de la laine préalablement oxydée. Cette différence atteint une amplitude maximale d'environ 0,6U.A. après 5 minutes de réaction.

Le profil de la cinétique obtenu avec la fibre chlorée peut être schématiquement décomposé en deux parties. Dans un premier temps (t < 2 minutes), l'absorbance à 280nm augmente rapidement jusqu'à 0,6U.A. puis ralentit pour tendre vers une valeur d'environ 0,8U.A. au bout de 5 minutes de réaction. Trois hypothèses peuvent être avancées pour interpréter cette allure :

- Une perte de l'activité enzymatique en moins de 5 minutes. Ce phénomène ne doit toutefois pas être majoritaire dans la mesure où il va à l'encontre des courbes de stabilité thermique réalisées ultérieurement.
- L'enzyme s'adsorbe rapidement sur les fibres ce qui induit l'apparition de contraintes diffusionnelles limitant l'efficacité de l'hydrolyse. Cette situation est classique lors de la mise en œuvre d'enzymes avec des substrat solides. En effet, l'adsorption de l'enzyme sur le substrat est une étape indispensable permettant de rendre ce dernier accessible à l'enzyme.
- La concentration du substrat ne reste pas saturante sur la durée totale de l'hydrolyse. Dans cette hypothèse, il faut donc envisager qu'une partie restreinte des fibres est réellement rendue accessible aux protéases par le prétraitement oxydatif.

Une expérience complémentaire en deux étapes a été élaborée pour éclaircir cette situation. Dans un premier temps l'hydrolyse d'un échantillon de laine traitée par le chlore a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires que précédemment. Puis, au bout des 5 minutes de catalyse, le milieu réactionnel a été supplémenté par une quantité d'enzyme égale à celle introduite à t=0. La figure 29 illustre le résultat obtenu.



Figure 29 : Evolution de l'absorbance à 280nm du milieu réactionnel. Les enzymes (10µl de GC 897, 140µl de Bactosol WO) sont introduits à t=0 minute et t=5 minutes (marqué par une flèche).

L'évolution de l'absorbance du milieu réactionnel après seconde addition de l'enzyme (t > 5 minutes) n'atteint pas l'amplitude observée initialement (t < 5 minutes). Le pallier apparu entre la 5^{ème} et la 6^{ème} minute est simplement associé à l'absorption intrinsèque de l'enzyme qui est réintroduit dans le milieu sans que l'hydrolyse des fibres redémarre réellement. Ainsi, si elles existent, les hypothèses de dénaturation enzymatique et de contraintes diffusionelles initialement postulées sont très secondaires. Il semble en effet que le traitement oxydatif améliore très nettement la sensibilité d'une partie restreinte des fibres aux protéases. Cette portion serait rapidement hydrolysée (t < 2 minutes) et laisserait place à des résidus de laine dont l'attaque est comparable à celle obtenue avec des fibres brutes (t > 2 minutes). Cette situation est compréhensible si l'on considère la réactivité élevée du chlore sur la laine et la durée extrêmement brève de l'étape d'oxydation (< 10s). Ainsi, le chlore ne doit pas diffuser au cœur des fibres et limiterait majoritairement son action en surface.

Deux axes de recherche complémentaires ont été envisagés pour évaluer plus finement l'impact des différents traitements oxydatifs et enzymatiques. En premier lieu, nous avons cherché à mettre en évidence des modifications pouvant être observées avec les outils analytiques spécifiques aux métiers de la laine (finesse, couleurs...). Dans un deuxième temps, l'analyse des lipides de surface à été entreprise.

1.2.2. Caractérisation des propriétés des fibres modifiées par les outils de l'industrie lainière

Il n'existe pas de test unique permettant de rendre compte de manière objective de la qualité globale (résistance, couleur, finesse...) d'un échantillon de fibres modifié ou non. Or, un procédé avéré efficace sur le critère d'infeutrabilité ne doit pas introduire simultanément de modification irréversible qui en limiterait la valeur d'utilisation (donc marchande). Une analyse multifactorielle de ces modifications a ainsi été envisagée :

• Mesure de l'aptitude au feutrage. Il s'agit du critère essentiel constituant l'objectif central de ce travail. Le test de Blankenbourg à la fois rapide et efficace permet d'évaluer une densité de feutrage (en g/cm³) d'un petit échantillon de laine introduit dans un volume de liquide connu et soumis à une agitation contrôlée. Ce paramètre évolue dans les gammes de valeur de 0,200-0,130g/cm³ pour les feutrages intenses, de 0,130-0,100g/cm³ pour les feutrages moyens et de 0,100-0,05g/cm³ pour les feutrages faibles. Les densités inférieures ou égales à 0,05g/cm³ n'étant obtenues que dans le cas de fibres parfaitement infeutrables, elles restent difficilement mesurables.

• Mesure du diamètre moyen et de la proportion des fibres dont le diamètre est supérieur à 30µm. Le pourcentage de fibres dont le diamètre est supérieur à 30µm définit l'état de dégradation de l'échantillon de laine. En effet, sachant que le diamètre moyen des fibres brutes utilisées dans cette étude est d'environs 21µm, les mesures supérieures à 30µm sont observées uniquement dans le cas de fibres "éclatées". Lorsque ce pourcentage atteint une valeur critique trop élevée, des difficultés de filature apparaissent et limitent ainsi la valeur de ces fibres.

• Mesure du degré de blanc et de jaune. Ces mesures sont parfaitement en accord avec l'aspect visuel des fibres qui conditionne en partie leur valeur marchande. La blancheur est exprimée dans une unité de grandeur qui doit idéalement être la plus faible possible pour se rapprocher du blanc absolu. Sur le marché, les variations maximales de ce paramètre oscillent entre 52 (grandeur sans unité) pour les fibres les moins blanches et 42 pour les plus blanches.

Le degré de jaune doit aussi être considéré avec beaucoup d'attention. De manière générale cette mesure varie dans un domaine de valeurs compris entre 11 pour les fibres les moins jaunes et 15 pour les lots les plus jaunes. Les laines les plus jaunes ne pouvant en effet être utilisées pour la confection d'articles textiles clairs.

• Observation par microscopie électronique à balayage.

Les résultats des mesures dimensionnelles et colorimétriques obtenus sur les différents échantillons de fibre brute ou oxydée par le chlore et hydrolysée ou non par les protéases ont été reportés dans le tableau 10 :

<u>**Tableau 10**</u>: Evolution des caractéristiques dimensionnelles (finesse, pourcentage de fibres de diamètre supérieur à $30\mu m$: %> $30\mu m$), colorimétriques (blancheur : W, jaune), et de feutrage des fibres de laine oxydées par le chlore ou non, traitées ou non par les protéases du *GC 897* (2%, v/m).

Echantillon	Finesse (µm)	%>30μm (%)	Blancheur (W)	Jaune	Feutrage (g.cm ⁻³)
Laine brute	21,1	4,3	49,2	12,7	0,161
Laine oxydée par le chlore	20,8	4,3	47,0	12,5	0,064
Laine brute hydrolysée	21,2	4,9	45,9	11,3	0,157
Laine oxydée par le chlore et hydrolysée	20,2	3,9	45,5	11,7	<0,05

Par rapport aux lots de laine brute, l'oxydation n'affecte ni le diamètre des fibres (finesse $\approx 21 \mu$ m) ni le pourcentage de fibres de diamètre supérieur à 30μ m (%> 30μ m $\approx 4,3$ %). Il n'y a donc pas d'altération directe liée à l'application de ce traitement. Par contre, l'hydrolyse enzymatique de l'échantillon chloré diminue ces deux caractéristiques ce qui n'est pas le cas pour la protéolyse de la laine brute. En accord avec l'hypothèse précédente, l'attaque des protéases semble se limiter à la surface des fibres prétraitées, ce phénomène de "ponçage" (finesse : $21,1 \rightarrow 20,2 \mu$ m) s'accompagne de l'élimination des fibres dégradées (%> 30μ m : $4,3 \rightarrow 3,9$ %). Bien maîtrisé, ce type de réaction est très favorable car il devrait conduire à l'élimination sélective de la cuticule directement impliquée dans les phénomènes de feutrage. Les mesures réalisées à ce niveau montrent en effet une diminution importante de la densité de feutrage dans le cas des laines oxydées par le chlore. Le meilleur résultat étant obtenu avec les fibres ayant en plus subi l'hydrolyse enzymatique (feutrage non mesurable).

L'observation des fibres par microscopie électronique à balayage illustre l'analyse des modifications dimensionnelles discutées précédemment (figure 30).

Fibre brute traitée par l'enzyme



Fibre brute

Figure 30 : Observation en microscopie électronique à balayage de fibres brutes et oxydées par le chlore, traitées ou non par la préparation de protéasique GC 897 (grossissement 2000×).

Aucun changement profond ne peut être noté entre les fibres brutes et les fibres brutes traitées par les protéases. L'hydrolyse de cet échantillon entraîne l'élimination partielle des écailles de cuticule dont on peut voir quelques résidus décollés. Ces modifications ont naturellement une incidence sur le diamètre moyen des fibres de laine ayant subi une oxydation et un traitement enzymatique.

Parallèlement, les caractéristiques colorimétriques de ces échantillons sont améliorées par les traitements (tableau 10). Notons l'évolution sensible de la blancheur amorcée par l'oxydation de la laine brute (W \approx 49,2 \rightarrow 47,0) mais les meilleurs résultats sont obtenus après traitement

enzymatique quel que soit la nature des fibres de départ (W≈45). De plus, ces hydrolyses diminuent également le degré de jaune des échantillons (jaune≈12,6 \rightarrow 11,5). Ces évolutions positives peuvent être attribuées à l'élimination de suint et d'un certain nombre de résidus aromatiques colorés tels que le tryptophane présent à la surface des fibres (Gilleßen et coll., 1995 ; Schäfer et coll., 1995).

Les modifications d'ordre biochimique survenues après oxydation et hydrolyse enzymatique sont également l'objet de cette étude.

Dans leur revue, Heine et Höcker (1995) proposent une explication permettant de mieux comprendre l'augmentation de l'efficacité de l'hydrolyse par les protéase sur les fibres de laine oxydées par rapport aux fibres brutes. Pour ces auteurs, les procédés d'oxydation entraînent des changements à la fois morphologiques et biochimiques de la surface des fibres. Ainsi, le caractère hydrophile de la laine oxydée augmente suite à la destruction plus ou moins poussée de la couche « F » épicuticulaire et par l'oxydation des cystines de la couche A de l'exocuticule (35% de Cys) en acide cystéique.

De telles modifications ont été recherchées en étudiant plus précisément les lipides de la couche « F ».

1.2.3. Analyse d'un marqueur lipidique de surface

L'étude bibliographique a mis en évidence que les acides gras de la couche « F » épicuticulaire sont liés de manière covalente à la surface des fibres de laine. Leur présence est donc naturellement influencée par les traitements affectant l'état de surface de ces fibres comme par exemple l'oxydation par le chlore. Parmi ces lipides, le 18-méthyleicosanoate (MEA) correspondant à l'acide gras majoritaire n'est retrouvé dans aucune autre structure de la laine. Une mesure quantitative du MEA peut donc rendre compte de l'état de surface d'une fibre de laine ayant subi ou non une modification chimique et/ou enzymatique.

Nous avons donc cherché à isoler, identifier et quantifier cette molécule.

1.2.3.1. Analyse qualitative de l'acide 18-méthyleicosanoïque

Dans un premier temps, nous avons lavé les fibres de laine par des mélanges chloroforme/méthanol. Cette étape importante permet d'éliminer les lipides non liés de manière covalente qui auraient pu interférer ultérieurement avec les mesures de chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les lipides liés de manière covalente sont libérés par saponification, extraits, puis dérivés sous forme d'ester de méthyle et enfin séparés par CPG. Le chromatogramme obtenu dans
le cas de la laine vierge est présenté figure 31 :



Figure 31 : Temps de rétention et profil chromatographique des lipides liés de manière covalente aux fibres de laine obtenus par CPG (détection par ionisation de flamme).

Trois pics majoritaires apparaissent au niveau de ce spectre (n° 1, 4 et 8). L'identification des composés 1 et 4 a été réalisée en comparant leurs temps de rétention à ceux des standards commerciaux des acides palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0), respectivement.

Le pic 8 dont l'aire est très importante peut correspondre au MEA. De plus, son temps de rétention (28 minutes 54 secondes) est très proche de celui de l'ester de méthyle de l'acide henecosanoïque (C21:0 linéaire) dont le facteur de réponse est d'ailleurs considéré comme identique à celui du MEA par de nombreux auteurs.

Pour approfondir l'identification de ces pics, l'échantillon a été analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM). Les ions moléculaires de ces spectres de fragmentation en impacts électroniques ont permis d'identifier les composés regroupés dans le tableau 11 :

<u>**Tableau 11</u>** : Identification des esters de méthyle d'acide gras isolés par CPG. Les numéros de pic font référence à ceux définis figure 31.</u>

Composé N°	lon moléculaire (^m / _z)	Nature
1	270	C16:0
2	284	C17:0
3	296	C18:1
4	298	C18:0
5	312	C19:0
6	326	C20:0
7	326	C20:0
8	340	C21:0
9	354	C22:0
10	368	C23:0

Le composé d'intérêt numéro 8 pressenti pour être le MEA a été étudié dans le détail, son spectre de masse est présenté figure 32A. L'ion moléculaire m/z=340 peut correspondre au MEA. L'interprétation des autres fragmentations primaires est schématisée au niveau de la figure 32B.

A1



Figure 32 : **A** : Spectre total de fragmentation en impacts électroniques de l'ester de méthyle majoritaire 8 (A1) et détail des fragmentation dans la gamme 150 < m/z < 350 (A2) **B** : interprétation du spectre par fragmentations du MEA.





Figure 32(fin) : **A** : Spectre total de fragmentation en impacts électroniques de l'ester de méthyle majoritaire 8 (A1) et détail des fragmentation dans la gamme 150 < m/z < 350 (A2) **B** : interprétation du spectre par fragmentations du MEA.

Nous notons que le spectre obtenu pour le composé n°8 présente des points communs avec celui publié par Wertz et Downing, (1988) identifiant le MEA.

Ces auteurs identifient le MEA en appuyant en grande partie leur analyse sur la présence de l'ion moléculaire $m/_z = 340$ caractéristique d'un C21:0 ainsi que sur la différence d'intensité entre les fragments M-29 (C₂₀H₃₉O₂^{+•}) et M-31 (C₂₁H₄₁O^{+•}). Wertz et Downing concluent que la valeur du rapport M-29/M-31=2,2 ne peut être obtenue qu'en présence d'un carbone C₁₈ substitué.

Nous avons trouvé pour le composé n°8 un rapport M-29/M-31=3,1 alors que dans les même conditions nous obtenons un rapport M-29/M-31=0,6 sur le spectre de C21:0 linéaire (acide hénécosanoïque).

Cette démarche présentée par Wertz et Downing, (1988) permettant d'identifier le pic 8 au MEA est en accord avec l'analyse théorique de fragmentation des chaînes carbonées. En effet, sous impact électronique, la rupture d'une liaison σ (C-C) de l'acide gras est obtenue avec le départ préférentiel de l'électron liant qui appartient au carbone le plus substitué. Ainsi, l'intensité du carbocation résultant de cette fragmentation est d'autant plus élevée que le carbone est ramifié (figure 33) :

$$R_{3}C^{+}>R_{2}HC^{+}>R_{1}H_{2}C^{+}>CH_{3}^{+}$$

Figure 33 : Intensité des carbocations en fonction de leurs substitutions.

L'ion M-29 est donc plus intense à partir du MEA qu'à partir de l'acide hénécosanoïque.

L'analyse détaillée du spectre de la figure 32A montre toutefois des ambiguïtés. En effet, comment expliquer la présence des ions $m_z = 297$ et $m_z = 43$ qui ne peuvent être obtenus par fragmentation primaire simple du MEA mais très facilement à partir d'une chaîne d'acide gras linéaire comme celle de l'hénécosanoate ($m_z = 297$: $(CH_2)_{17}$ -COOCH₃^{+•} ; $m_z = 43$: CH₃-(CH₂)₂^{+•}). Toutefois, dans le cas de $m_z = 43$, une explication probable est la fragmentation secondaire de l'ion Mac Lafferty $m_z = 74$ illustrée figure 34 :



Figure 34 : Origine hypothétique de l'ion m/z=43. L'ion m/z=74 est généré par fragmentation primaire du MEA par le mécanisme de Mac Lafferty (équation du haut). Cet ion subit une fragmentation secondaire aboutissant à la formation d'un cétène à m/z=43 (équation du bas).

Aucun mécanisme satisfaisant n'a été trouvé vis à vis de l'ion m/z=297.

Dans l'objectif d'éclaircir ce problème et pour confirmer l'identification du MEA, nous avons transformé les esters de méthyle obtenus précédemment en dérivés N-acyl pyrrolidides. Cette technique s'était avérée particulièrement efficace lors de l'étude d'acides gras insaturés et/ou branchés isolés à partir d'éponge (Miralles et coll., 1995; Barnathan et coll., 1996). Le chromatogramme de ces dérivés traités par CPG de la figure 35 montre un profil comparable à celui des esters de méthyle de la figure 31 :



Figure 35 : Chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse des dérivés N-acyl pyrrolidides des lipides liés de manière covalente aux fibres de laine.

Nous avons réalisé le spectre de masse du pic 8 et de l'acide hénécosanoïque dérivé sous forme de N-Acyl pyrrolidide (figure 36A). Les fragmentations sont facilement interprétées à partir du MEA et du C21:0 linéaire (figure 36B).



A

FRAGMENTATION DE L'ACIDE HENECOSANOIQUE

<u>Figure 36</u> : A : spectre de masse dans la zone m/z=150 à 400 des dérivés en N-acyl pyrrolidide du composé n°8 (haut) et de l'acide hénécosanoïque (bas). B : Interprétation des fragmentations du MEA (haut) et de l'acide hénécosanoïque (bas).





DERIVE N-ACYL PYRROLIDIDE DE L'ACIDE HENECOSANOIQUE

<u>Figure 36(fin)</u> : A : spectre de masse dans la zone m/z=150 à 400 des dérivés en N-acyl pyrrolidide du composé n°8 (haut) et de l'acide hénécosanoïque (bas). B : Interprétation des fragmentations du MEA (haut) et de l'acide hénécosanoïque (bas).

Cette technique permet d'obtenir des fragments intenses provenant uniquement des ruptures du côté de la fonction acide carboxylique transformée en amide.

Nous observons sur le spectre du composé 8 un abaissement de l'intensité de l'ion $m_z=336$ (flèche) concomitant à l'augmentation de $m_z=350$, ce qui est tout à fait significatif de la substitution du carbone C₁₈ par un résidu méthyle. Cette tendance est naturellement inversée dans le spectre de l'acide henecosanoïque. Pour cet acide linéaire, $m_z=336$ est un fragment intense car

il est obtenu par une rupture primaire de la chaîne carbonée ce qui n'est pas le cas pour le MEA où un réarrangement secondaire est nécessaire. Cependant, dans le cas du MEA, la présence de $m/_z=336$ ne constitue pas un élément gênant l'identification. En effet, le même type de spectre pour des dérivés en N-Acyl pyrrolidides d'acides gras ramifiés est obtenu dans les travaux publiés par Miralles et coll., (1995) ainsi que par Barnathar et coll., (1996). Par ailleurs, Yu et coll., (1988) ont observé également cette fragmentation de faible intensité à partir d'acides gras ramifiés dérivés sous forme diméthyloxazoline (DEMOX).

Ces résultats complémentaires à ceux de la fragmentation des esters de méthyle nous confortent dans l'identification du MEA au niveau du composé n°8. Une démarche quantitative peut maintenant être envisagée.

1.2.3.2. Analyse quantitative de l'acide 18-méthyleicosanoïque

En absence de standard commercial du MEA, cette mesure est obtenue par rapport à une gamme étalon d'acide hénécosanoique dont le facteur de réponse est identique à celui du MEA. Par ailleurs, l'acide nonadécanoïque absent des lipides de la laine a été utilisé en tant qu'étalon interne lors du dosage par CPG. Les mesures obtenues sur les différents échantillons ont été regroupées (tableau 12).

<u>**Tableau 12**</u> : Evolution du taux d'acide 18-méthyleicosanoïque des fibres de laine oxydées ou non par le chlore et traitées ou non par les protéases.

Echantillon	Taux de 18-méthyleicosanoate (mg/g de fibre)	% relatif de 18-méthyleicosanoate perdu
Laine brute	1,010±0,06	0%
Laine oxydée par le chlore	0,623±0,06	38%
Laine brute traitée par les protéases	0,927±0,06	0%
Laine oxydée par le chlore traitée par les protéases	0,442±0,06	56%

La valeur obtenue dans le cas des fibres de laine brute est en accord avec celle retrouvée dans la littérature, oscillant de 0,93mg/g (Negri et coll., 1991) à 1,71mg/g (Wertz et Downing, 1989). La dispersion de ces valeurs s'explique par le fait que la production du MEA par l'animal dépend de nombreux facteurs : âge, alimentation, race, voire diamètre des fibres.

Les traitements protéolytiques des fibres brutes n'affectent pas, compte tenu de la précision sur la mesure, la quantité de MEA. Ce résultat illustre parfaitement l'inefficacité du traitement enzymatique vis à vis des fibres de laine native. Par contre, à l'issue du traitement oxydatif, le taux de MEA chute de 38% par rapport aux fibres brutes. Le chlore agit donc au moins en partie sur la surface des fibres au niveau de l'épicuticule. Ces modifications améliorent nettement l'attaque enzymatique et réduisent ainsi à nouveau la quantité de MEA (perte totale : 56%).

En résumé : Le 18-méthyleicosanoate localisé au niveau de l'épicuticule est un marqueur qui nous renseigne sur l'état de surface des fibres. Après isolement par chromatographie en phase gazeuse, l'identification par spectrométrie de masse de cet acide gras a fait l'objet d'une étude approfondie selon deux méthodes. Dans une première étape, la technique classique de dérivation sous forme d'ester de méthyle fut mise en œuvre puis complétée par une dérivation sous forme de dérivé de N-acyl pyrrolidide, cette dernière technique étant particulièrement adaptée à l'analyse fine des acides gras à longue chaîne carbonée. Par la suite, les mesures du taux de cet acide gras après le traitement par le chlore indiquent une modification profonde de l'épicuticule (perte : 38%). L'augmentation de la mouillabilité et l'amélioration de l'efficacité de l'attaque protéolytique de cet échantillon sont une conséquence directe de ces changements de surface (perte totale : 56%).

A la suite de ces résultats encourageants, nous avons cherché à confirmer l'efficacité du traitement à l'aide du test normé de lavage en machine.

1.2.4. Mise en évidence de l'efficacité du traitement irrétrécissable des fibres de laine après oxydation par le chlore puis protéolyse enzymatique

Cette expérience réalisée avec la collaboration de l'Institut Textile de France (ITF) sur des pièces de tissus tricotées a nécessité la préparation d'échantillons d'environ 100g de fibres. Cette matière préalablement oxydée par le chlore à 2% est traitée 20 minutes à 60°C par 10 litres d'une solution à 13,5g/l de *Maxacal 60000L* ajustée à pH=9 avec de la soude. Le *Maxacal 60000L* est une préparation enzymatique de subtilisine correspondant au *GC 897* dilué au ¼. L'échantillon non traité présente un retrait total à l'issu du test de 80%. Dans les mêmes conditions, l'échantillon traité par le chlore puis soumis à l'hydrolyse enzymatique présente un retrait de seulement 3,5%. Ce résultat, permet de revendiquer le label lavable machine pour les articles chaussants dont les normes sont les plus restrictives du marché. Notons cependant que l'ITF émet quelques réserves étant donnée la faible taille de l'échantillon. La figure 37 illustre ces résultats :



Figure 37 : Photographie des pièces de tissu à l'issu du test TM31. ① : échantillon de fibre brute non traitée, ② : fibre oxydée par le chlore à 2% puis soumise à l'hydrolyse enzymatique par le *Maxacal 60000L* (photographie au 1/5).

A ce stade de l'étude, la présence éventuelle de protéases adsorbées à la surface des fibres à l'issue du traitement doit être envisagée. Dans cette hypothèse, la reprise non contrôlée de l'activité protéolytique peut avoir des conséquences dommageables. Or, nous avons précédemment montré que le domaine d'activité des subtilisines était compatible avec les programmes de température des lave-linge. Ainsi, toute trace d'enzyme doit être éliminée des échantillons traités.

Des échantillons de fibres oxydées par le chlore $(1,00\pm0,05g)$, préalablement traités par la préparation protéolytique *GC 987*, puis essorés sont soumis à différentes procédures de dénaturation enzymatique (tableau 13). A l'issue de cette étape, les échantillons essorés ont été introduits dans une solution d'hémoglobine à 5%. L'activité enzymatique résiduelle a été mesurée dans le surnageant après 10 minutes d'incubation à 25°C. Les résultats ont été rapportés par rapport à l'activité d'un témoin d'hydrolyse positif constitué par un échantillon de laine oxydée par le chlore, traité par la préparation de protéases et n'ayant subi aucune étape de dénaturation.

<u>**Tableau 13</u>** : Etude comparative sur l'efficacité de la dénaturation des protéases adsorbées sur les fibres de laine.</u>

Traitement dénaturant	% de l'activité résiduelle de référence
Référence sans traitement dénaturant	100% (0,61 µmole de tyrosine/min/g de fibre)
Rinçage par 3×1 litre d'eau	61%
Incubation 10 minutes dans une étuve à 100°C	68%
Immersion 5 minutes dans une solution $d^3H_2SO_4$ à pH 4,0 et rinçage	48%
Immersion 5 minutes dans une solution $d^3H_2SO_4$ à pH 2,5 et rinçage	0%
Immersion 5 minutes dans une solution $d^3H_2SO_4 a pH 1,9$ et rinçage	0%
Immersion 2 minutes dans une solution $d^{2}H_{2}SO_{4} a pH 1,9$ et rinçage	0%

Le traitement thermique à 100°C ne permet pas d'éliminer la totalité de l'activité enzymatique résiduelle. Ce résultat est dommageable car cette méthode aurait permis de réaliser l'étape d'inactivation en utilisant les séchoirs couramment employés dans l'industrie lainière. Les inactivations par rinçage à l'eau ou à pH=4 ne sont pas plus satisfaisantes. Par contre, ces résultats montrent la possibilité de dénaturer irréversiblement les enzymes par immersion dans une solution acide à pH<2,5 pendant 5 minutes ou

pH=1,9 pendant 2 minutes. Nous avons finalement choisi cette dernière solution dans la suite de l'étude.

En résumé : Après une caractérisation sommaire de l'activité protéolytique du *GC 897*, nous avons montré que la sensibilité à l'attaque enzymatique des fibres dépendait de leur oxydation préalable par le chlore. Ainsi, les fibres de laine brute sont peu sensibles à l'attaque enzymatique des subtilisines. Par contre, l'oxydation préalable par le chlore augmente significativement l'efficacité de l'hydrolyse. L'étude a montré que ce type de prétraitement n'affecte qu'une partie restreinte de la fibre dès lors rendue accessible à l'action des enzymes. L'élimination de cette fraction (au moins une partie de la cuticule) diminue l'aptitude au feutrage des échantillons sans en affecter l'intégrité. Parallèlement, l'augmentation de la blancheur et la diminution du degré de jaune ont également été observées après oxydation et protéolyse. Par la suite, l'étude des modifications fines de la cuticule a permis d'observer la chute du taux de 18-méthyleicosanoate présent à la surface des fibres traitées.

L'efficacité des protéases dans le but d'obtenir une laine irrétrécissable a été démontrée par le test TM31 de lavage en machine. De plus, la dénaturation des protéases adsorbées au fibres afin d'éviter des hydrolyses non contrôlées des fibres a également été mise au point.

L'oxydation par le chlore, bien que très répandue dans l'industrie est aujourd'hui fortement critiquée par les instances environnementales. Dans ce contexte, après cette étude générale sur l'action du chlore, une oxydation alternative a été recherchée.

2. Recherches de prétraitements alternatifs à l'oxydation des fibres de laine par le chlore

Nous avons montré l'efficacité du procédé de traitement irrétrécissable des fibres de laine reposant sur une oxydation par le chlore suivie d'une hydrolyse enzymatique par les subtilisines. Cependant, l'utilisation du chlore n'étant pas envisageable dans le procédé final qui se veut avant tout écologique, nous avons cherché à le remplacer.

Trois types d'oxydation ont été retenus pour cette étude : l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène en présence de métaux ou d'oxydes métalliques, l'oxydation par l'acide performique et enfin, l'oxydation par l'ozone.

Afin d'évaluer l'efficacité de ces oxydations relativement au procédé à mettre au point, deux méthodes d'analyse éprouvées précédemment sur les fibres oxydées par le chlore ont été retenues en raison de leur rapidité de mise en œuvre et de leur fiabilité :

- La sensibilité à l'attaque des protéases a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280nm des peptides libérés au cours de l'hydrolyse protéasique des fibres.
- Les caractéristiques colorimétriques et dimensionnelles d'échantillons de laine oxydés n'ayant pas subi d'attaque enzymatique ont également été recherchées.

2.1. Oxydation par le peroxyde d'hydrogène en présence de métaux ou d'oxyde métalliques

L'oxydation des fibres de laines par l'oxygène singulet produit à partir du peroxyde d'hydrogène en présence d'ion tungstate (WO_4^{2-}) a été décrite dans le brevet déposé par Dybal et coll. en 1996. Nous avons expérimenté cette approche dans des conditions très voisines de celles de ces auteurs. En plus, nous avons testé d'autres catalyseurs générant de l'oxygène singulet à partir du peroxyde d'hydrogène comme l'ion molybdate (MoO_4^{2-}) et l'ion calcium (Ca^{2+}) ainsi que le réactif de Fenton (H_2O_2/Fe^{2+}) qui ne génère que des espèces radicalaires. La sensibilité à l'attaque protéolytique de lots de laine traités par les

différents systèmes d'oxydation et leurs caractéristiques dimensionnelles ainsi que leurs couleurs sont reportées sur la figure 38 et le tableau 14 :



HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE FIBRES OXYDEES PAR LE SYSTEME H_2O_2/WO_4^{2-}

HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE FIBRES OXYDEES PAR LE SYSTEME H₂O₂/M₀O₄²⁻







HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE FIBRES OXYDEES PAR LE SYSTEME H₂O₂/Ca²⁺

HYDROLYSE ENZYMATIQUE D'UNE FIBRES OXYDEES PAR LE SYSTEME H $_2O_2$ /Fe²⁺ 0,20 Durée des traitements oxydatifs \diamond 0,18 0 témoin sans oxydation 2 min 0,16 5 min Δ 10 min ∇ Absorbance à 280 nm 0,14 ∇ 20 min \Diamond \diamond 0 0,12 ∇ \bigtriangleup 0,10 \diamond ନ୍ଦ ∇ 0,08 Ø ¢ Δ 0,06 Ø 8 0,04 0,02 0 0 0,00 Ć 1 2 3 4 5 0 Durée de l'hydrolyse (min)

Figure 38 (fin) : Sensibilité à l'attaque enzymatique de différents lots de laine oxydée par H₂O₂/WO₄²⁻, H₂O₂/MoO₄²⁻, H₂O₂/Ca²⁺, H₂O₂/Fe²⁺ et d'un lot de laine témoin non traité. Pour chaque expérience, des durées d'application variables ont été réalisées.

Système	Durée de	Finesse	%>30µm	Blancheur	Jaune
<u>a oxydation</u>		(μιπ)	(70)	(W)	12.0
temoin	0	21,1	4,3		13,0
	0,5	21,3	4,4	45,8	10,1
$U_{0} = 0.000^{2}$	1	20,0	2,9	51,5	12,8
H_2O_2/WO_4	2	20,8	3,5	57,8	15,8
	5	22,4	6,7	66,5	16,8
	0,5	21,4	4,4	49,2	13,3
$H \cap D \cap O^{2^{-}}$	1	21,3	4,3	51	14,2
H_2O_2/MOO_4^2	2	19,5	2,4	50,2	11,9
	5	19,9	2,9	69,4	20,7
	2	21,2	4,3	44,8	11,7
	5	21,1	4,2	45,1	11,25
$\Pi_2 U_2 / Ca$	10	21,3	4,1	42,3	11,25
	20	21,0	4,4	40,7	9,9
U.O. /D. ²⁺	2	20,6	4,3	52,8	14,4
	5	20,9	4,1	56,2	14,7
П ₂ U ₂ /ге	10	20,9	4,5	67,1	20,6
	20	20,6	4,2	70,4	19,55

<u>**Tableau 14**</u> : Caractéristiques dimensionnelles et colorimétriques de lots de laine oxydés par les différents systèmes.

Comme le montre la figure 38, l'oxydation, même longue (20 minutes), par les systèmes H_2O_2/Ca^{2+} et H_2O_2/Fe^{2+} n'améliore pas la sensibilité à l'attaque enzymatique des fibres de laine. De plus, dans le cas du réactif de Fenton (H_2O_2/Fe^{2+}) la blancheur des fibres est fortement altérée au profit d'un jaunissement (tableau 12). Ces caractéristiques semblent par contre légèrement améliorées avec le système H_2O_2/Ca^{2+} . Il s'agit sans doute de l'action liée à H_2O_2 dont les propriétés blanchissantes sur les fibres kératinisées sont bien connues. La dégradation d' H_2O_2 par Ca²⁺ serait donc très limitée ou trop lente. Ces deux prétraitements peuvent ainsi d'ores et déjà être éliminés.

Les systèmes H_2O_2/WO_4^{2-} et H_2O_2/MoO_4^{2-} améliorent très nettement l'action protéolytique des subtilisines. En effet la figure 38 montre que pour ces systèmes, la sensibilité à l'attaque par les protéases augmente avec la durée de l'oxydation. Cependant, ils altèrent de manière concomitante la blancheur tout en augmentant le degré de jaune (tableau 14). Dans le cas du système H_2O_2/WO_4^{2-} , le pourcentage de fibres avec un diamètre supérieur à 30µm diminue entre 0,5 et 1 minute d'application pour finalement augmenter entre 1 et 5 minutes. Dans la première phase (≤ 1 minute) il semble que les fibres dégradées qui sont naturellement présentes dans la laine non traitée ($\approx 4,3\%$) soient éliminées par l'oxydation. Puis, dans une deuxième phase (> 1 minute), des fibres intactes sont à leur tour attaquées et dégradées. Cette analyse peut également être appliquée au système H₂O₂/MoO₄²⁻, mais elle doit être nuancée. Comme en témoignent les courbes de sensibilité à l'attaque protéolytique, le système H₂O₂/MoO₄²⁻ est moins puissant que le système H₂O₂/WO₄²⁻. De manière similaire, l'impact du système H₂O₂/MoO₄²⁻ sur le pourcentage de fibres avec un diamètre supérieur à 30µm est lui aussi diminué. Entre 0,5 et 5 minutes d'application, l'oxydation élimine plus de fibres dégradées qu'elle n'en produit. On peut légitimement penser que cette situation s'inverserait pour des temps d'application plus longs. Pour les deux systèmes oxydants H₂O₂/MoO₄²⁻ et H₂O₂/WO₄²⁻, il n'y a pas d'évolution significative du diamètre moyen des fibres.

2.2. Oxydation par l'acide performique

L'oxydation des protéines par l'acide performique est un procédé classique pour rompre les ponts disulfure (Hirs et coll., 1956, 1967). Bien qu'étant réalisée habituellement en 2 heures à -10°C, de manière à ménager l'intégrité des protéines, nous avons préféré travailler sur une courte période et à température ambiante dans des conditions plus en rapport avec celles réalisables au niveau industriel.

L'action des subtilisines à été testée sur des fibres oxydées entre 0 et 120 minutes par HCO₃H. La sensibilité des fibres à l'hydrolyse par les protéases est confirmée par la libération importante de peptides dans le milieu réactionnel (figure 39).



Figure 39 : Mesure de la sensibilité à l'attaque protéolytique de lots de laine ayant subit une oxydation par l'acide performique pendant une durée variable.

Malheureusement, les fibres traitées pendant 60 et 120 minutes par l'agent oxydant sont très endommagées et ne peuvent pas être analysées plus finement. Les caractéristiques colorimétriques et dimensionnelles des autres fibres sont regroupées dans le tableau 15 :

<u>**Tableau 15</u>** : Caractéristiques dimensionnelles et colorimétriques des différents lots de laine oxydée et d'un témoin non traité.</u>

Agent oxydant	Durée de l'oxydation (min)	Finesse (µm)	%>30µm (%)	Blancheur (W)	Jaune
témoin	0	21,3	4,3	49,4	12,7
HCO₃H⁻	5	21,5	5,1	48,8	14,1
	10	21,2	4,9	50,3	14,1
	20	21,4	4,9	50,2	13,7
	30	22,3	7,8	51,7	17,4

Tous les traitements oxydants entraînent un jaunissement dont le niveau reste constant lors des 20 premières minutes d'oxydation (jaune \approx 14) pour atteindre une valeur critique au bout de 30 minutes de réaction Le diamètre, le pourcentage de fibres ayant un diamètre supérieure à 30µm ainsi que le degré de blanc n'évoluent pas de manière significative jusqu'à 20 minutes de traitement. Par contre, l'évolution de ces paramètres au bout de 30

minutes atteste du début de la dégradation des fibres entre 60 et 120 minutes. Cette dégradation à été confirmée par l'observation en microscopie électronique à balayage (figure 40).



Figure 40 : Observation en microscopie électronique des fibres de laine ayant subi une oxydation de 15 minutes par l'acide performique (grossissement : 600× pour la photographie de gauche et 2000× pour celle de droite).

De nombreuses fissures peuvent être observées à la surface des fibres, cette fragilisation nous laisse prévoir une chute importante de la résistance à l'étirement des fibres traitées par ce procédé.

2.3. Oxydation par l'ozone

L'oxydation par l'ozone des fibres kératinisées a déjà été réalisée dans le passé mais elle n'a jamais été suivie d'une attaque enzymatique (Thorsen, 1980 ; Bradlhey et coll., 1993). L'étude bibliographique a montré que deux types d'attaque par l'ozone sont envisageables : une action moléculaire de l'ozone et une attaque mettant en œuvre des radicaux dont l'apparition est sans doute favorisée par le présence d'eau (Nayme, 1997 ; Schulte et coll., 1995).

Les traitements par l'ozone ont été réalisés durant 15 minutes sous 2 bars de pression par un flux de 2l/min d'oxygène contenant $100g d'O_3/m^3$. Deux échantillons ont été préparés : un traitement sur $10,05\pm0,05g$ de fibres non humidifiées (h.r. : 12,5% (g/g)) et un traitement sur $10,05\pm0,05g$ de fibres immergées 10 minutes dans 1 litre d'eau distillée puis essorées sous une presse d'environ $25kg/cm^2$. Dans ce dernier cas, l'humidité relative mesurée était d'environ 50% (g/g). La sensibilité à l'attaque enzymatique des échantillons ainsi obtenus est reportée figure 41 :



<u>Figure 41</u> : Sensibilité à l'attaque protéolytique des différents lots de laine oxydée par O_3 (15 minutes, 2l/min, 100g d' O_3/m^3) et d'un témoin non traité.

Cette figure montre clairement que la sensibilité des fibres à l'attaque des protéases dépend de leur taux d'humidité fixé au moment de l'étape d'oxydation par l'ozone. Notons que les profils de ces cinétiques de relargage de peptides sont bien plus proches de celui obtenu lors du chlorage que de ceux issus du traitement par l'acide performique ou par le peroxyde d'hydrogène en présence de métaux ou d'oxydes métalliques. Ce résultat nous laisse présager un mécanisme d'action différent entre les deux type d'oxydation.

Par ailleurs, les fibres dont le taux d'humidité relative est de 12,5% (g/g) ne consomment pas d'ozone en quantité mesurable alors que la consommation atteint 46mg/g de fibres dans le cas des matières dont l'hydratation est fixée à 50% (g/g) d'humidité relative (tableau 16). La présence d'eau est donc indispensable au traitement d'oxydation des fibres. L'hypothèse d'un mécanisme au moins en partie radicalaire peut donc être envisagée. Les mesures ne permettent pas de constater une évolution significative des caractéristiques dimensionnelles des fibres. Le traitement par l'ozone semble en revanche diminuer légèrement le degré de jaune et augmenter la blancheur des fibres. <u>**Tableau 16**</u> : Caractéristiques dimensionnelles et colorimétriques des différents lots de laine oxydée et d'un témoin non traité.

Oxydatio n	Humidité relative des fibres lors de l'oxydation (%, g/g)	Consommation d'ozone (mg O ₃ /g de fibres)	Finesse (µm)	%>30µm (%)	Blancheur (W)	Jaune
témoin	-	-	21,3	4,3	49,4	12,7
0	12,5%	0	21,3	4,9	45,5	12,6
O_3	50%	46	21,2	4,3	46,0	12,3

Comme dans le cas de l'acide performique, nous avons observé les modifications engendrées par le traitement ozone par microscopie électronique à balayage (figure 42) :



Figure 42 : Observation en microscopie électronique à balayage de fibres de laine traitée par ozone (15 minutes, 21/min, $100gO_3/m^3$) (grossissement photographie **a** : $600 \times$; photographie **b** : $2000 \times$).

Contrairement à l'acide performique, le traitement par l'ozone n'affecte pas de manière significative les fibres de laine. Ces observations, comparables à celle obtenue avec le chlore, montrent l'absence de fissure et un lissage partiel de la surface de certaines fibres. Dans ce cas, ces modifications ne permettent pas de modifier le diamètre moyen des fibres, le traitement ozone serait donc peut être moins agressif que celui à base de chlore.

<u>En résumé</u> : A l'issue de cette étude comparative des prétraitements alternatifs à l'oxydation des fibres de laine par le chlore, seules les oxydations par les systèmes

d'oxydants H_2O_2/WO_4^{2-} , H_2O_2/MoO_4^{2-} , O_3 , et l'acide performique ont amélioré la sensibilité des fibres à l'attaque des protéases. L'existence de protection industrielle forte (Dybdal et coll., 1995), d'un coût élevé et d'une innocuité environnementale douteuse des procédés à base de peroxyde d'hydrogène et de métaux ou d'oxyde métalliques nous a conduit à éliminer cette voie au profit des techniques d'oxydation à base d'ozone et d'acide performique pour la suite de l'étude.

3. Optimisation de l'hydrolyse enzymatique de fibres oxydées par l'acide performique ou l'ozone

Les oxydations des fibres de laine par l'ozone et l'acide performique se sont avérées très prometteuses, aussi une étude plus approfondie a donc été entreprise avec ces deux oxydants appliqués en amont de l'hydrolyse par les protéases.

3.1. Oxydation par l'acide performique

Le traitement antifeutrant de la laine par oxydation à l'acide performique suivi d'une attaque enzymatique constitue une base de travail séduisante. Cette méthode semble relativement simple et peu onéreuse et ne nécessite pas de compétence particulière et d'investissement dans un matériel spécifique. Nous avons donc cherché à optimiser le procédé. Cette opération a été réalisée en deux étapes :

En premier lieu, nous avons testé l'importance relative de divers facteurs ou variables X (température, concentrations...) susceptibles d'influer le résultat du traitement Y (blancheur, feutrage...). De nombreuses interactions entre ces facteurs pouvant être envisagées, l'optimisation du procédé par l'approche "classique" consistant à faire varier alternativement chaque facteur en fixant tous les autres à un niveau constant est inadaptées. Par contre, la réalisation d'un plan d'expériences factoriel à deux niveaux (2^k, avec k facteurs) présente de multiples avantages :

- l'effet de chaque facteur et de leur interaction est mesurable quantitativement ;
- la mesure des effets est obtenue avec une très grande précision car elle est calculée à partir de l'ensemble des expériences réalisées dans le plan ;
- une modélisation mathématique est envisageable dans les cas simples.

Dans un deuxième temps, l'optimisation du procédé à partir des facteurs importants a été envisagée en utilisant la méthode séquentielle du Simplex.

3.1.1. Recherche des facteurs influents par la méthode des plans d'expériences 2^k

Les facteurs retenus pour cette étude sont :

- La durée d'oxydation ;
- L'application d'un traitement protéolytique (200µl/1 de GC 897) à différentes températures;
- La concentration en acide performique ;
- La température d'oxydation.

Pour chaque facteur deux valeurs délimitant le domaine expérimental à un niveau haut (U_i^+) et bas (U_i^-) ont été fixées (tableau 18). Ces niveaux sont notés respectivement +1 et -1 en terme de variable X_i dite codée ou centrée réduite. Cette notation qui revient à un changement d'unité de mesure et d'origine permettra de traiter tous les facteurs de la même manière lors du calcul des effets, ceci quelque soit leur unité de mesure initiale (°C, minutes...).

<u>**Tableau 18**</u>: Définitions des variables codées X_i . La valeur réelle, non codée du facteur X_i à son niveau +1 est définies par le terme U_i^+ et la valeur réelle, non codée du facteur X_i à son niveau -1 est définie par le terme U_i^- .

Facteurs	Variable codée	Niveau X _i =+1	Niveau X _i =-1
Durée de l'oxydation	X ₁	$U_1^+=15$ minutes	$\overline{U_1} = 5$ minutes
Température de l'enzyme	X ₂	$U_2^+=55^{\circ}C$	$U_2^{-}=35^{\circ}C$
Concentration de HCO ₃ H	X ₃	$U_3^+=0,83M$	$U_3 = 0,083M$
Température d'oxydation	X ₄	$U_4^+=33^{\circ}C$	$U_4 = 10^{\circ}C$

La matrice d'expérience (X) du plan factoriel complet est constituée par toutes les combinaisons possibles des k facteurs pris à leurs deux niveaux. Dans le cas présent k=4, il y a donc $n=2^4=16$ expériences. Pour chacune d'entre elles, la réponse Y du traitement est évaluée par mesure de la blancheur (W), du degré de jaune, de la finesse, du pourcentage de fibres dont le diamètre est supérieur à $30\mu m$ (%< $30\mu m$), de la densité de feutrage et de la ténacité. Ce dernier paramètre est une mesure directe de la dégradation des fibres par le traitement. La ténacité normale des fibres est d'environs 8cN/Tex; toute diminution de cette valeur est dommageable. Dans les cas les moins défavorables de ténacité comprise entre 8 et 7,5cN/Tex, les dommages entraînent la chute des cadences de production en filature. En aucun cas, le traitement d'infeutrabilité ne doit diminuer la ténacité des fibres en deçà d'une

valeur de 7,5cN/Tex. Ce paramètre devait donc être pris en compte dans cette étude. La matrice d'expérience X et les réponses sont reportées dans le tableau 19 :

	Var	iables (codées	(X _i)			Ré	ponses (Y)	
Experience	v	\mathbf{v}	\mathbf{v}	v	Blancheur	Jaune	Finesse	%>30	Ténacité	Feutrage
II (U)		Λ_2	Λ3	Λ_4	(W)		(µm)	(%)	(cN/Tex)	(g/cm^3)
1	-1	-1	-1	-1	41,9	10,8	21,15	4,3	8,33	0,179
2	+1	-1	-1	-1	40,7	10,0	21,30	5,0	8,24	0,170
3	-1	+1	-1	-1	41,7	10,4	21,20	4,7	7,78	0,168
4	+1	+1	-1	-1	40,3	10,2	21,15	4,5	8,21	0,170
5	-1	-1	+1	-1	41,9	11,5	21,45	4,8	8,52	0,214
6	+1	-1	+1	-1	45,0	14,0	21,40	4,8	7,81	0,211
7	-1	+1	+1	-1	47,1	13,7	21,10	4,2	7,69	0,184
8	+1	+1	+1	-1	46,0	12,1	21,20	4,6	6,55	0,120
9	-1	-1	-1	+1	40,9	10,6	21,15	4,1	8,28	0,190
10	+1	-1	-1	+1	40,3	10,6	21,45	4,3	8,34	0,192
11	-1	+1	-1	+1	40,7	10,0	21,20	4,3	8,32	0,168
12	+1	+1	-1	+1	40,4	10,5	21,00	3,9	8,24	0,174
13	-1	-1	+1	+1	46,0	14,3	21,50	4,9	7,54	0,199
14	+1	-1	+1	+1	47,3	14,8	21,60	5,7	5,09	0,098
15	-1	+1	+1	+1	48,3	15,8	21,25	5,1	5,27	0,069
16	+1	+1	+1	+1	51,1	17,1	21,90	7,3	2,75	0,090

<u>**Tableau 19**</u> : Matrice d'expérience X du plan factoriel complet 2^4 et réponses Y obtenues pour chaque expérience.

Une première observation montre que le plan d'expérience améliore d'ores et déjà le procédé. En effet, un échantillon infeutrable est obtenu dans l'expérience u=15 en seulement 5 minutes. Par ailleurs, ces résultats permettent d'évaluer les effets (b) de chaque facteur et de leur interaction. Ce calcul peut être formalisé simplement sous forme matricielle (Goupy, 1988, 1996 ; Delacroix et Porte 1996A) :

Y=X.E

Avec Y : la matrice des réponses

- X : la matrice expérience contenant les variables codées
- E : la matrice des effets recherchés

La matrice des effets doit être isolée. Dans le cas des plans d'expériences factoriels, X est une matrice d'Hadamard dont les propriétés permettent d'écrire :

$$\mathbf{E} = \frac{1}{n} \mathbf{X}^{\mathsf{t}} \mathbf{Y}$$

Avec X^t la matrice transposée de X

n : le nombre d'expériences du plan

Finalement, sans entrer dans le détail de ce calcul matriciel, les effets et interactions peuvent être obtenus grâce aux formules suivantes (Lantéri et coll., 1981) :

• Pour les effets principaux b_i :

$$b_{i} = \frac{\left(\sum_{u=1}^{n} X_{ui} Y_{u}\right)}{n} \qquad \left\{i \in [1,4]\right\}$$
(2)

Avec X_{ui} : la valeur de la i^{ème} variable codée à la u^{ème} expérience (soit +1 ou -1).

Y_u : la réponse mesurée à la u^{ème} expérience

n : le nombre d'expérience du plan (ici n=16)

Ainsi, le calcul de l'effet b₁ correspondant au facteur X₁ sera d'après l'équation (2) :

$$b_{1} = \frac{(-Y_{1} + Y_{2} - Y_{3} + Y_{4} - Y_{5} + Y_{6} - Y_{7} + Y_{8} - Y_{9} + Y_{10} - Y_{11} + Y_{12} - Y_{13} + Y_{14} - Y_{15} + Y_{16})}{16}$$

Dans le cas particulier où la réponse étudiée est la blancheur $b_1 = 0,2$

• De même, pour les effets d'interaction du premier ordre b_{ij} :

$$b_{ij} = \frac{\left(\sum_{u=1}^{n} X_{ui} X_{uj} Y_{u}\right)}{n} \qquad \left\{i, j \in [1, 4]\right\} \quad i \neq j$$

• Pour les effets d'interaction du deuxième ordre b_{ijk} :

$$b_{ijk} = \frac{\left(\sum_{u=1}^{n} X_{ui} X_{uj} X_{uk} Y_{u}\right)}{n} \qquad \left\{i, j, k \in [1, 4]\right\} \quad i \neq j \neq k$$

• Pour les effets d'interaction du troisième ordre b_{ijkl} :

$$b_{ijkl} = \frac{\left(\sum_{u=1}^{n} X_{ui} X_{uj} X_{uk} X_{ul} Y_{u}\right)}{n} \qquad \left\{i, j, k, l \in [1, 4]\right\} \ i \neq j \neq k \neq l$$

L'analyse de l'effet de chaque facteur et de leur interaction doit être évaluée en tenant compte de l'impact de l'erreur expérimentale liée à la mesure des réponses Y (Goupy, 1988). Ainsi, l'oxydation de 10,05±0,05g de laine traitée 10 minutes à 22°C par 1 litre de d'HCO₃H 0,41M en absence de traitement enzymatique a été reproduite à cinq reprises. Le calcul de l'écart type s obtenu sur cet échantillonnage est utilisé pour estimer l'erreur expérimentale Δ_Y en admettant que sa répartition correspond à celle d'une courbe de Student, c'est à dire à une répartition ressemblant à une courbe gaussienne aplatie pour tenir compte du fait qu'un nombre restreint de mesures ont été réalisées pour apprécier Δ_Y . Ainsi, pour cinq mesures de Y, l'intervalle de confiance Δ_Y sera de ±2,78×s autour de la valeur mesurée avec une probabilité d'exactitude de 95%.

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \times \sum_{u=1}^{N} (y_u - \mu)^2} \quad \{u \in [1,5] \}$$

Avec N : taille de l'échantillon (ici N=5), y_u : la réponse Y mesurée à la u^{ème} expérience et μ : la moyenne arithmétique des réponses Y sur les 5 expériences.

Enfin, l'évaluation de Δ_Y permet de calculer l'erreur expérimentale sur l'effet (Δ_E). Par opposition aux méthodes traditionnelles dans lesquelles chaque facteur est étudié indépendamment de tous les autres, l'approche du plan d'expérience met à contribution la totalité des facteurs dans chacune des expériences. Dans ce cas, l'erreur sur l'effet Δ_E est calculée en tenant compte de l'ensemble des réponses du test. Ce paramètre est donc obtenu avec une bien plus grande précision. Le théorème de la variance que nous ne développerons pas ici formalise cette approche du calcul de Δ_E :

$$\Delta_{\rm E} = \frac{\Delta_{\rm Y}}{\sqrt{n}}$$

Avec n le nombre d'épreuves contenues dans la matrice d'expérience ($n=2^4=16$ dans le cas d'un plan factoriel complet à 4 facteurs).

L'ensemble des réponses mesurées sur les 5 essais, le calcul de Δ_Y et de Δ_E ont été regroupés dans le tableau 19.

<u>**Tableau 19**</u> : Mesure brute des réponses Y obtenues sur des fibres de laine traitée 10 minutes à 22°C par 1 litre de HCO₃H 0,41M et calcul de l'erreur expérimentale $\Delta_{\rm Y}$ et de $\Delta_{\rm E}$.

	Blancheur	Jaune	Finesse	%>30µm	Ténacité (aN/Tar)	Feutrage
	<u>(w)</u>		(μ)	(70)	(CIN/TEX)	(g/cm)
expérience n°1	45,4	13,3	21,4	4,3	8,21	0,189
expérience n°2	45,9	13,3	21,2	4,5	8,22	0,174
expérience n°3	46,0	13,9	21,1	4,7	8,06	0,187
expérience n°4	45,9	13,9	21,3	4,7	7,72	0,181
expérience n°5	46,3	13,7	21,2	4,3	7,82	0,174
Moyenne	45,9	13,6	21,2	4,5	8,01	0,180
S	0,3	0,3	0,1	0,2	0,23	0,010
$\Delta_{\rm Y}$ (95%)	±0,9	±0,8	±0,3	±0,5	±0,63	±0,020
$\Delta_{\rm E}$ (95%, n=16)	±0,2	±0,2	±0,1	±0,1	±0,16	±0,005

L'ensemble des calculs des effets obtenus à partir de la matrice des réponses Y et des erreurs sur chaque effet ont été reportés dans le tableau 20 : <u>**Tableau 20**</u>: Effet des facteurs et de leurs interactions sur les réponses Y. Chaque résultat est accompagné de l'erreur sur l'effet (Δ_E) inhérent à l'erreur expérimentale sur la mesure. Les valeurs en gras correspondent aux résultats significatifs.

Differen	Blancheur	Jaune	Finesse	%>30µm	Ténacité	Feutrage
Effets	(W)		(µm)	(%)	(cN/Tex)	(g/cm^3)
b1	0,2±0,2	0,1±0,2	0,1±0,1	0,2±0,1	-0,4±0,3	-0,009±0,005
b ₂	0,7±0,2	0,2±0,2	-0,1±0,1	0,0±0,1	-0,5±0,3	-0,019±0,005
b3	2,9±0,2	1,9±0,2	0,1±0,1	0,4±0,1	-0,9±0,3	-0,014±0,005
b4	0,6±0,2	0,7±0,2	0,1±0,1	0,2±0,1	-0,6±0,3	-0,015±0,005
b ₁₂	-0,2±0,2	-0,1±0,2	0,0±0,1	0,0±0,1	-0,0±0,3	$0,005\pm0,005$
b ₁₃	0,6±0,2	0,2±0,2	0,0±0,1	0,2±0,1	$-0,4\pm0,3$	$-0,009\pm0,005$
b ₁₄	0,2±0,2	0,2±0,2	0,0±0,1	0,1±0,1	$-0,2\pm0,3$	0,000±0,005
b ₂₃	0,8±0,2	0,3±0,2	0,0±0,1	0,1±0,1	-0,4±0,3	-0,013±0,005
b ₂₄	0,0±0,2	0,2±0,2	0,0±0,1	0,2±0,1	$-0,1\pm0,3$	-0,003±0,005
b ₃₄	0,9±0,2	0,7±0,2	0,1±0,1	0,4±0,1	-0,7±0,3	-0,019±0,005
b ₁₂₃	-0,2±0,2	-0,3±0,2	0,1±0,1	0,2±0,1	$-0,1\pm0,3$	0,003±0,005
b ₁₂₄	0,4±0,2	0,3±0,2	0,1±0,1	0,1±0,1	-0,0±0,3	0,011±0,005
b ₁₃₄	0,0±0,2	0,0±0,2	0,0±0,1	0,2±0,1	$-0,2\pm0,3$	-0,002±0,005
b ₂₃₄	0,0±0,2	0,3±0,2	0,1±0,1	0,2±0,1	$-0,2\pm0,3$	0,001±0,005
b ₁₂₃₄	0,3±0,2	0,3±0,2	0,0±0,1	0,0±0,1	0,1±0,3	0,012±0,005

Toutes les valeurs reportées dans le tableau 20 sont exprimées dans la même unité de mesure que la réponse Y_i considérée. Cette propriété qui améliore avantageusement la lisibilité des résultats est liée à l'utilisation de variables centrées réduites. Notons que seuls les effets et interactions supérieurs à l'erreur Δ_E peuvent être analysés. Pour plus de sécurité, n'ont été retenus que les coefficients dont les valeurs sont bien supérieures à Δ_E (en gras).

Le jaunissement des fibres de laine est dommageable, il doit être le plus faible possible. L'analyse des effets montre que la concentration de l'agent d'oxydation (X_3) et la température de l'oxydation (X_4) augmente de manière importante le jaunissement (b_3 et b_4). L'interaction forte b_{34} entre ces deux facteurs est donc normale. Pour mieux comprendre l'effet d'interaction nous allons étudier plus en détail ce cas :

A partir des 4 facteurs initiaux, seul X_3 et X_4 ont finalement présenté une influence significative. Dans ces conditions, parmi les 16 essais réalisés au cours du plan d'expériences un certain nombre apparaît redondant. Par exemple, il est possible de faire la moyenne des résultats des expériences 1, 2, 3 et 4 pour lesquels X_3 et X_4 sont au niveau -1. Cette opération répétée pour toutes les combinaisons possibles de ces facteurs pris à leurs deux niveaux revient à réaliser quatre plans 2^2 (tableau 21).

<u>**Tableau 21**</u>: Moyennes des mesures du degré de jaune pour les expériences apparaissant redondantes dans le plan d'expérience 2^4 précédent. Dans ce cas, seuls les facteurs X_3 et X_4 sont considérés influents.

X ₃ ([HCO ₃ H])	X ₄ (Température d'oxydation)	Essais du plan initial 2 ⁴	Moyenne des réponses de jaune
-1	-1	1; 2; 3; 4	10,3
+1	-1	5; 6; 7; 8	12,8
-1	+1	9; 10; 11; 12	10,4
+1	+1	13; 14; 15; 16	15,5

Ces résultats sont illustrés de manière plus explicite dans la figure 43 :



Figure 43 : Représentation schématique de l'évolution du jaune en fonction des différents niveaux de X_3 ([HCO₃H]) et X_4 (température d'oxydation).

Dans le cas où la concentration en acide performique est fixée à son niveau bas (-1), le degré de jaune n'évolue pas significativement lors du changement du niveau de température (- $1\rightarrow+1$). Par contre une augmentation d'environ trois points de jaune est observée si la concentration en acide performique est initialement fixée à son niveau haut (+1). Il y a donc un phénomène d'interaction entre la concentration de l'agent oxydant et la température de l'oxydation. Ce résultat est mesuré quantitativement par la valeur de b₃₄. Cette analyse est généralisable à l'ensemble des interactions reportées dans le tableau 20.

La blancheur est un paramètre important pouvant affecter la valeur marchande de la laine. Rappelons que sa mesure est exprimée dans une unité de grandeur qui doit être idéalement la plus faible possible pour se rapprocher du blanc absolu. Les trois facteurs influant ce paramètre sont par ordre d'importance, la concentration en acide performique (X₃), la température du traitement enzymatique (X₂) et la température de l'oxydation (X₄). Leurs effets respectifs b₃, b₂ et b₄ sont des grandeurs positives qui affectent donc négativement la blancheur. L'impact de la concentration en acide performique est tel que des interactions importantes sont logiquement apparues avec les facteurs X₂ et X₄ (b₂₃, b₃₄). Dans le même sens, une interaction de X₃ avec la durée de l'oxydation X₁ est également observable malgré la faible influence de ce dernier facteur (b₁₃).

Dans le domaine expérimental étudié aucun effet significatif ne semble influencer la finesse des fibres de laine. Ainsi, cette réponse ne pourra pas faire ultérieurement l'objet d'une modélisation mathématique.

Le pourcentage de fibres dont le diamètre est supérieur à $30\mu m$ est un indicateur de l'état physique des fibres. Une valeur importante de ce pourcentage peut être le signe de la dégradation des fibres par éclatement. Ce tableau montre que seule la concentration de l'acide performique (X₃) est influente (b₃). Ce facteur interagit également négativement avec la température de l'oxydation X₄ (b₃₄). L'importance de l'erreur Δ_E incite à la plus grande prudence lors de l'interprétation des autres facteurs.

La ténacité idéalement la plus grande possible est fortement diminuée par la concentration en acide performique (X₃) et la température de l'oxydation (X₄) et plus modestement par la température de la solution de protéases (X₂). Les interaction b_{34} sont donc normales. Ces résultats corroborent ceux obtenus avec le pourcentage de fibres dont le diamètre est supérieur à 30µm et montrent que tout traitement par l'acide performique entraînera malheureusement l'altération de la résistance des fibres.

La densité de feutrage est l'un des paramètres les plus importants à l'origine de ces travaux. Cette densité doit être la plus faible possible car elle est en partie responsable du rétrécissement au lavage des pièces de tissu. Comme pour la blancheur, les trois facteurs principaux qui influencent le feutrage sont : la concentration en acide performique (X₃), la température du traitement enzymatique (X_2) et la température de l'oxydation (X_4) . Quelques interactions entre ces facteurs sont logiquement observées (b_{23}, b_{34}) .

A ce niveau de l'étude, une modélisation mathématique peut être envisagée. Le modèle mathématique obtenu pour chaque réponse du plans d'expériences factoriels à deux niveaux est un polynôme du premier degré par rapport à chacune des variables codées prise indépendamment. Les coefficients du polynôme sont la moyenne, les effets principaux et les effets d'interactions. En théorie, pour un plan factoriel à deux niveaux, la réponse calculée η prend la forme suivante :

$$\eta = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{14} X_1 X_4 + b_{23} X_2 X_3 + b_{24} X_2 X_4 + b_{34} X_3 X_4 + b_{123} X_1 X_3 X_4 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 X_4 + b_{1234} X_$$

ou b₀ est la moyenne des réponses Y :

$$b_0 = \frac{\left(\sum_{u=1}^n Y_u\right)}{n}$$

Avec n, le nombre d'expériences du plan et Y, la réponse mesurée à la u^{ème} expérience.

En pratique, le modèle doit être épuré des coefficients non significatifs qui peuvent compromettre sa validité. Le logiciel informatique *Modde 4.0* a permis d'affiner les modèles mathématiques sur la base de deux tests statistiques :

• Dans l'hypothèse où le modèle postulé est en adéquation avec la réalité, la différence entre la valeur expérimentale Y_u et son estimation calculée η_u est uniquement due à l'erreur expérimentale sur la mesure. Ces différences également appelées résidus suivent donc une loi de distribution normale de moyenne nulle et de variance constante. Dans cette hypothèse, la répartition des résidus introduits dans un repère semi-normal définissent une droite. L'estimation du coefficient de régression linéaire r² de cette courbe permet de caractériser la pertinence du modèle mathématique postulé.



 L'homogénéité entre les séries de résultats théoriques et expérimentaux est également évaluée par la probabilité P_{x2} du test au Khi-2.

Finalement, les effets principaux et les effets d'interactions introduits dans les modèles optimisés ont été facilement choisis de façon à maximiser les coefficients r^2 et $P_{\chi 2}$. Les résultats ainsi obtenus sont reportés dans le tableau 22 :

<u>**Tableau 22</u>** : Formulation et évaluation statistique des modèles mathématiques retenus pour chaque réponse.</u>

Réponse à estimer	Modèle mathématique	Test statistique		
Yi	$\eta_i = 1$	r^2	$P_{\chi 2}$	
Blancheur (W)	$b_0 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{34} X_3 X_4$	0,9621	0,8637	
Jaune	$b_0+b_3X_3+b_4X_4+b_{34}X_3X_4$	0,8797	0,8323	
%>30µm	$b_0 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_{34} X_3 X_4$	0,5560	0,3215	
Ténacité (cN/Tex)	$b_0 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_{34} X_3 X_4$	0,7346	0,5381	
Densité de feutrage (g/cm ³)	$b_0+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_4+b_{23}X_2X_3+b_{34}X_3X_4$	0,7372	0,4379	

L'évolution de la blancheur, du jaunissement des fibres de laine au cours du traitement peut être prédite finement car les coefficients r^2 et $P_{\chi 2}$ des modèles correspondants sont très élevés et proches de la valeur idéale de 1. L'approche du pourcentage de fibres dont le diamètre est supérieur à 30µm, de la ténacité et de la densité de feutrage est moins bonne mais reste toutefois exploitable.

Les modèles obtenus sont utilisés pour calculer des courbes d'isoréponses valables à l'intérieur du domaine expérimental couvert par le plan d'expériences. L'exactitude de telles courbes dépend naturellement des coefficients r^2 et $P_{\chi 2}$. A titre d'exemple, et pour illustrer le problème majeur du traitement par l'oxydation à l'acide performique puis hydrolyse par les protéases, deux courbes d'isoréponses ont été représentées figure 44.



Figure 44 : Courbe d'isoréponse de la densité de feutrage et de la ténacité en fonction de la température de l'étape d'oxydation et de la concentration de l'acide performique.



Figure 44 : Courbe d'isoréponse de la densité de feutrage et de la ténacité en fonction de la température de l'étape d'oxydation et de la concentration de l'acide performique.



Figure 44 (fin) : Courbe d'isoréponse de la densité de feutrage et de la ténacité en fonction de la température de l'étape d'oxydation et de la concentration de l'acide performique.

Ces courbes illustrent parfaitement l'influence positive de l'augmentation de la concentration de l'acide performique et de la température de l'étape d'hydrolyse enzymatique sur la diminution de l'aptitude au feutrage des fibres. Malheureusement, ces mêmes facteurs auxquels s'ajoute la température de la solution oxydante diminuent la résistance (ou ténacité) des fibres. Il n'existe donc pas de formulation simple permettant d'obtenir le traitement infeutrable en maintenant une ténacité suffisante. Une optimisation plus poussée par la méthode Simplex a ainsi été envisagée (Delacroix et Porte, 1996A, 1996B).

3.1.2. Optimisation du procédé par la méthode Simplex

3.1.2.1. Principe

Cette méthode permet de rechercher une réponse optimale de manière séquentielle sans modélisation. Pour un procédé dépendant de k facteurs X_i influents, le premier Simplex est constitué par k+1 expériences. Après avoir déterminé les réponses Y, on élimine la plus mauvaise et on calcule les conditions opératoires d'un nouvel essai en prenant le symétrique de
Notons que dans certains cas, les conditions opératoires calculées ne sont pas réalisables expérimentalement ou correspondent à l'essai réalisé précédemment. Dans cette hypothèse c'est le 2^{ème} plus mauvais point et non plus le 1^{er} qui doit être utilisé pour calculer les conditions opératoires du nouvel essai. Le principe général du Simplex est ainsi résumé par le schéma de la figure 46.



Figure 46 : Principe général de l'optimisation par la méthode du Simplex.

3.1.2.2. Optimisation de la ténacité et du feutrage des fibres traitées par l'acide performique

L'étude par le plan d'expériences du traitement infeutrable impliquant l'acide performique a montré que 3 facteurs étaient particulièrement influents : la température de la solution enzymatique de *GC 897* (X₂), la concentration de l'acide performique (X₃) et la température de l'étape d'oxydation (X₄) (*cf.* tableau 21). L'augmentation de ces facteurs améliore le caractère infeutrable des fibres de laine traitée (b₂=-0,019±0,005 ; b₃=-0,014±0,005 ; b₄=-0,015±0,005g/cm³) . Toutefois, la résistance des fibres définie par leur ténacité est malheureusement diminuée de manière concomitante (b₂=-0,46±0,3 ; b₃=-0,91±0,3 ; b₄=-0,58±0,3cN/Tex). Nous avons cherché à optimiser le niveau des deux facteurs X₃ et X₄ dans le procédé de façon à minimiser le feutrage des fibres tout en imposant une ténacité \geq 7,5cN/tex. L'étape d'hydrolyse enzymatique a été réalisée à U₂=55°C en raison de l'influence positive de cette température sur le feutrage et de son impact modéré sur la chute de ténacité. Par ailleurs, l'analyse du plan d'expériences a également révélé que la durée de l'oxydation n'a pas une influence prépondérante sur l'efficacité de traitement infeutrable (b₁=-0,009±0,005g/cm³). En accord avec les contraintes industrielles, la durée de l'oxydation a été fixée dans ce Simplex à U₁=5 minutes.

Dans le cas des optimisations Simplex de type 1, la matrice codée de la première série d'expériences est imposée. Cette matrice dont la structure générale pour k facteurs à été développée dans le chapitre matériel et méthode est reportée tableau 24 dans le cas précis des deux facteurs X_3 et X_4 .

Tableau 24 : Matrice d'expérience codée du premier Simplex dans le cas de deux facteurs (X3 et X4).

expérience n°(u)	X ₃ ([HCO ₃])	X_4 (Température d'oxydation)
Exp 1	0	0
Exp 2	0,9659	0,2588
Exp 3	0,2588	0,9659

Pour réaliser les expériences il est nécessaire de décoder cette matrice afin de connaître les valeurs que doivent prendre U_3 et U_4 pour les différents facteurs X_3 et X_4 à chaque expérience. Cette opération est obtenue en résolvant l'équation suivante :

$$U_i^{exp u} = U_i^{exp 0} + Pas_i \times X_i^{exp u}$$
(3)

Avec : $U_i^{exp u}$ le niveau réel du facteur i à l'expérience u, $U_i^{exp 0}$ le niveau initiale du facteur i à la première expérience, $X_i^{exp u}$ la valeur codée du facteur i à l'expérience u.

Les niveaux initiaux des facteur X_3 et X_4 ainsi que le pas de progression de ces facteurs dans le Simplex sont définis dans le tableau 25 :

Tableau 25 : Niveau initial et pas de progression du 1^{er} Simplex (I) pour X_3 et X_4 .

Facteur	Niveau initial	Pas du Simplex
X ₃ ([HCO ₃])	$U_3^{exp 0} = 10 \text{ ml}$	Pas ₃ =15 ml
X_4 (Température d'oxydation)	$U_4^{exp 0} = 15^{\circ}C$	Pas ₄ =5°C

Ainsi, la matrice expérimentale reportée dans le tableau 26 pour les 3 premières expériences est obtenue en résolvant de l'équation (3) :

Tableau 26 : Matrice d'expérience décodée du 1^{ér} Simplex (I) pour les facteurs X₃ et X₄.

Expérience	U ₃	U ₄	Simplex	Feutrage	Ténacité
n°(u)	(ml)	(°C)	$(\exp, (n^{\circ}))$	(g/cm^3)	(cN/tex)
Exp 1	$U_3^{exp} = 10$	$U_4^{exp l} = 15$		0,181	9,22
Exp 2	$U_3^{exp 2} = 24,5$	$U_4^{exp 2} = 16,5$		0,172	8,88
Exp 3	$U_3^{exp 3} = 13,9$	$U_4^{exp 3} = 20$	Exp 1,exp 2, exp 3, (I)	0,170	8,25

A l'issue de cette première série d'épreuves, nous constatons que la première expérience est la plus mauvaise car la densité de feutrage est maximale. Les conditions opératoires de l'épreuve n°4 sont donc calculées à partir de l'épreuve n°1 : A l'issue de cette première série d'épreuves, nous constatons que la première expérience est la plus mauvaise car la densité de feutrage est maximale. Les conditions opératoires de l'épreuve n°4 sont donc calculées à partir de l'épreuve n°1 :

$$U_{3}^{\exp 4} = \frac{2 \times \left(U_{3}^{\exp 2} + U_{3}^{\exp 3}\right)}{2} - U_{3}^{\exp 1} = \frac{2 \times \left(24, 5 + 13, 9\right)}{2} - 10 = 28,4 \text{ m}$$

Un calcul similaire permet de déterminer $U_4^{exp4} = 21,1^{\circ}C$

Le résultat de l'expérience 4 et l'évolution du Simplex ont été reportés dans le tableau 26 :

Expérience	U_3	U ₄	Simplex	Feutrage	Ténacité
n°(u)	(ml)	(°C)	(exp, (n°))	(g/cm^3)	(cN/tex)
Exp 4	$U_3^{exp 4} = 28,4$	$U_4^{exp 4} = 21,1$	Exp 2,exp 3, exp 4, (II)	0,191	8,64
Exp 5	$U_3^{exp 5} = 40,0$	$U_4^{exp 5} = 17,6$	Exp 2,exp 4, exp 5, (III)	0,158	7,62
Exp 6	$U_3^{exp 6} = 31,1$	$U_4^{exp 6} = 12,8$	Exp 2,exp 5, exp 6, (IV)	0,196	7,74
Exp 7	$U_3^{exp 7} = 49,6$	$U_4^{exp 7} = 14,1$	Exp 5,exp 6, exp 7, (V)	0,189	7,21
Exp 8	$U_3^{exp 8} = 53,5$	$U_4^{exp 8} = 18,9$	Exp 5,exp 7, exp 8, (VI)	0,148	6,73
Exp 9	$U_3^{exp 9} = 42,9$	$U_4^{exp 9} = 22,4$	Exp 5,exp 8, exp 9, (VII)	0,111	6,25

<u>Tableau 26</u> : Progression du Simplex (II à IX).

Dans le deuxième Simplex (II) constitué par les expériences 2, 3 et 4, nous constatons que l'essai 4 est le plus mauvais puisque le feutrage est maximal. Ce résultat est compréhensible si on considère qu'il existe un niveau d'oxydation qui induit l'écartement des écailles de cuticule par rapport à l'axe de la fibre sans augmenter leur sensibilité à l'attaque enzymatique. La mesure du diamètre moyen des fibres montre une augmentation d'environ 4% (finesse : $21,1\rightarrow21,9\mu$ m). Pour réaliser le 3^{ème} Simplex (III) l'élimination de l'expérience n°4 du Simplex II conduirait à refaire l'essai n°1. Pour obtenir les conditions opératoires de l'expérience n°5 nous devons donc éliminer le 2^{ème} plus mauvais point parmi les essais 2, 3, 4 soit l'expérience n°3. Le Simplex (III) est donc constitué par les expériences 2, 4, 5. Parmi ces expériences, l'essai n°4 est le plus mauvais et permet de calculer les cordonnées de l'expérience n°6 (Simplex IV : exp 2, exp 5, exp 6). Cette expérience répond au critère de ténacité mais présente un feutrage intense pouvant être interprété de manière similaire à

l'expérience à l'essai n°4 vis à vis d'un éventuel écartement des écailles. Les Simplex suivants (V à VII) ne permettent pas d'améliorer le traitement en raison des mesures de ténacité < 7,5cN/Tex. La progression des Simplex peut également être illustrée par la figure 47 :



<u>Figure 47</u> : Evolution du Simplex avec rotation autour du point optimal correspondant à l'expérience $n^{\circ}5$.

Finalement, l'expérience 5 apparaît comme la plus satisfaisante sur le plan du feutrage et de la ténacité (feutrage = 0,158g/cm³; ténacité = 7,62cN/Tex). Ce résultat reste toutefois insuffisant sur le plan industriel où une intensité de feutrage très inférieure doit être obtenue pour répondre au critère d'irrétrécissabilité au lavage machine. Nous avons donc abandonné le traitement des fibres par l'acide performique et le *GC 897* au profit du traitement prometteur à base d'ozone.

3.2. Oxydation par l'ozone

L'étude précédente (*cf.* 2.3.) a montré que des fibres de laine oxydées par l'ozone en conditions humides (50% h.r.) avaient une sensibilité à l'attaque par les protéases supérieure à celle de fibres prétraitées par l'ozone en conditions plus sèches (12,5% h.r.). Les premières hypothèses pour expliquer cette différence de sensibilité reposeraient sur l'existence d'un mécanisme d'action de type radicalaire observable dans les conditions les plus humides. L'étude bibliographique a montré que ces réactions pouvaient être favorisées par la présence de peroxyde d'hydrogène en solution alcaline (Nayme, 1997). Un plan d'expériences devrait permettre en plus d'une éventuelle optimisation, d'éclaircir ces mécanismes.

3.2.1. Recherche des facteurs influents par la méthode des plans d'expériences 2^k

Nous avons cherché dans un premier temps à déterminer par la méthode des plans d'expériences complets à deux niveaux, l'influence respective et interactive des facteurs suivants :

- La concentration de NaOH dans la solution utilisée pour humidifier les fibres avant l'oxydation ([NaOH]);
- La concentration en protéases de la solution d'hydrolyse ([GC 897]) ;
- La concentration d'H₂O₂ dans la solution utilisée pour humidifier les fibres avant l'oxydation ([H₂O₂]);
- La concentration de l'ozone dans le gaz de traitement des fibres de laine ([O₃]).

Pour chaque facteur, les bornes du domaine expérimental étudié ont été reportées dans le tableau 27 :

<u>Tableau 27</u> : Nature et niveaux des variables codées X_i et valeur U_i correspondante.

Facteur	Variable codée	Niveau X _i =-1	Niveau X _i =+1
[NaOH]	X1	U ₁ =0mM	$U_1=4mM$
[GC 897]	X ₂	$U_2 = 0 \mu l / l$	U ₂ =180µl/l
$[H_2O_2]$	X_3	U ₃ =0mM	U ₃ =250mM
[O ₃]	X4	U ₄ =30g O ₃ /m ³ ; 21/min ; 10min	$U_4 = 100 \text{ g O}_3/\text{m}^3$; 21/min; 10min

Pour quatre facteurs, la matrice expérimentale est constituée de 16 expériences. Pour chacune d'entre elles, cinq mesures de réponses ont été réalisées : la blancheur, le degré de jaune, la finesse de fibre, le pourcentage de fibres dont le diamètre est supérieur à 30µm et l'aptitude au feutrage. La matrice expérimentale X du plan d'expériences et les réponses obtenues sont rassemblées dans le tableau 28 :

<u>Tableau</u>	<u>28</u> :	Matrice	d'expériences	X	du	plan	factoriel	complet	2 ⁴	et	réponses	Y	obtenues	pour
chaque e	xpérie	ence.												

Eunórionaa	varia	ubles c	odées	(X_i)	Réponses (Y)					
Experience p ^o u	v.	v.	v.	v.	Blancheur	Jaune	Finesse	%>30µm	Feutrage	
nu		A2	A3	Δ4	(W)		(µm)	(%)	(g/cm^3)	
1	-1	-1	-1	-1	44,4	13,7	21,6	5,8	0,15	
2	+1	-1	-1	-1	43,8	11,4	21,6	5	0,142	
3	-1	+1	-1	-1	44,5	13,3	21,4	4,7	0,123	
4	+1	+1	-1	-1	43,7	12,2	21,5	4,6	0,131	
5	-1	-1	+1	-1	40,2	11,7	21,5	5,6	0,126	
6	+1	-1	+1	-1	41,2	11,75	21,6	4,9	0,118	
7	-1	+1	+1	-1	41,2	11,1	21,4	4,8	0,096	
8	+1	+1	+1	-1	40,7	10,2	21,5	5,6	0,094	
9	-1	-1	-1	+1	44,7	12,3	21,5	4,6	0,05	
10	+1	-1	-1	+1	43,4	12,3	21,2	4,7	0,05	
11	-1	+1	-1	+1	42,6	13,2	21,0	4,5	0,05	
12	+1	+1	-1	+1	41,8	11,8	20,4	4,2	0,05	
13	-1	-1	+1	+1	42,0	13,0	21,4	5,2	0,05	
14	+1	-1	+1	+1	42,7	12,6	21,0	4	0,05	
15	-1	+1	+1	+1	38,3	10,8	20,7	4,5	0,05	
16	+1	+1	+1	+1	39,5	10,7	20,5	4,2	0,05	

Pour l'ensemble de ces réponses, une analyse classique d'un plan d'expériences factoriel complet 2^4 peut être réalisée. Les effets et interactions calculés de manière identique à ceux du plan factoriel obtenu sur l'acide performique ont été reportés dans le tableau 29.

<u>**Tableau 29**</u>: Effet des facteurs et de leurs interactions sur les réponses Y. Chaque résultat est accompagné de l'erreur sur l'effet (Δ_E) inhérente à l'erreur expérimentale sur la mesure. Les valeurs en gras correspondent aux résultats significatifs.

Effet ou interaction	Blancheur	Jaune	Finesse	%>30μm	Feutrage
b.	0.1+0.2	0 4+0 2	0.1+0.1	(70)	(g/cm)
1	$-0,1\pm0,2$	-0,4±0,2	-0,1±0,1	-0,2±0,1	$-0,001\pm0,003$
b_2	-0,6±0,2	-0,3±0,2	$-0,2\pm0,1$	-0,2±0,1	$-0,006\pm0,005$
b3	-1,4±0,2	-0,5±0,2	$-0,0\pm0,1$	0,0±0,1	-0,007±0,005
b ₄	-0,3±0,2	0,1±0,2	-0,3±0,1	-0,3±0,1	-0,036±0,005
b ₁₂	0,0±0,2	0,0±0,2	0,0±0,1	0,2±0,1	0,001±0,005
b ₁₃	0,4±0,2	0,2±0,2	0,0±0,1	0,0±0,1	-0,001±0,005
b ₁₄	0,0±0,2	0,1±0,2	0,1±0,1	$-0,1\pm0,1$	0,001±0,005
b ₂₃	-0,2±0,2	-0,4±0,2	0,0±0,1	$0,1\pm0,1$	-0,001±0,005
b ₂₄	-0,7±0,2	-0,1±0,2	-0,1±0,1	0,0±0,1	0,006±0,005
b ₃₄	0,2±0,2	02±0,2	0,0±0,1	-0,1±0,1	$0,007\pm0,005$
b ₁₂₃	-0,1±0,2	0,0±0,2	0,0±0,1	$0,1{\pm}0,1$	-0,001±0,005
b ₁₂₄	0,2±0,2	-0,1±0,2	0,0±0,1	$-0,1\pm0,1$	-0,001±0,005
b ₁₃₄	0,1±0,2	-0,1±0,2	0,0±0,1	-0,1±0,1	0,001±0,005
b ₂₃₄	$-0,2\pm0,2$	-0,1±0,2	0,0±0,1	$-0,1\pm0,1$	0,001±0,005
b ₁₂₃₄	0,1±0,2	0,2±0,2	0,0±0,1	0,0±0,1	0,001±0,005

La blancheur des fibres est influencée par la concentration du peroxyde d'hydrogène (X₃), de la préparation enzymatique de *GC 897* (X₂) et de l'ozone (X₄). L'influence très relative de l'ozone (b₄) sur la blancheur par rapport aux autres facteurs b₃ et b₂ doit être interprétée avec prudence. En effet, si le changement de niveau de X₄ de 30 à 100gO₃/m³ n'occasionne qu'une faible amélioration de la blancheur (ΔW =-0,3±0,2) cela n'exclut pas que ce paramètre ait été fortement affecté entre 0 et 30gO₃/m³. Ainsi, la blancheur de la fibre obtenue en présence de 30gO₃/m³ (expérience n°1 : W=44,4) est bien meilleure que celle d'une fibre brute (W≈49-50). Par ailleurs, nous pouvons noter des interactions néfastes entre NaOH et le peroxyde d'hydrogène (b₁₃) et des interactions bénéfiques entre l'enzyme et l'ozone (b₂₄).

Le degré de jaune est diminué par la soude (X_1) , le *GC* 897 (X_2) et le peroxyde d'hydrogène (X_3) . Un effet coopératif entre ces deux derniers facteurs n'est donc pas étonnant (b_{23}) .

Ces résultats colorimétriques confirment donc l'impact positif du peroxyde d'hydrogène diminuant le degré de jaune et augmentant la blancheur. Il s'agit de fait de l'utilisation principale d' H_2O_2 dans l'industrie textile. L'enzyme diminue le degré de jaune et augmente la blancheur, son influence est donc bénéfique.

La finesse des fibres est influencée par la concentration de l'ozone (X₄) et de la préparation enzymatique de *GC 897* (X₂) sans qu'aucune interaction b_{24} ne soit toutefois observée. Ces deux facteurs diminuent le diamètre moyen des fibres. Cet effet est positif car la valeur marchande des fibres est inversement proportionnelle à leur diamètre si leur résistance n'est pas affectée. Sur ce dernier point, nous constatons que le pourcentage de fibres dont le diamètre est supérieur à 30µm diminue lors de l'application de l'ozone (b₄). Par ailleurs, nous constatons l'interaction négative de l'enzyme après oxydation en présence de soude (b₁₂).

L'aptitude au feutrage des fibres de laine traitées par l'ozone montre que ce facteur est très influent car la limite inférieure de mesure $(0,050g/cm^3)$ est atteinte dans l'ensemble des essais réalisés en présence de $100gO_3/m^3$ (expériences n° 9 à 16). L'effet de l'ozone (X₄) est très supérieur à celui des autres facteurs et aucune interactions avec les autres facteurs ne peut être constatée.

Une modélisation mathématique a été réalisée dans les mêmes conditions que celle du plan d'expériences sur l'acide performique. Les modèles obtenus sont reportés dans le tableau 30.

<u>**Tableau 30**</u> : Formulation et évaluation statistique des modèles mathématiques retenus dans le cas du plan factoriel 2^4 .

Réponses à estimer	Modèle mathématique	Test s	tatistique \mathbf{P}^2
Blancheur	$\frac{1}{b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_4+b_1b_3X_1X_3+b_2b_4X_2X_4}$	0,9455	0,7246
Jaune	$b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_2b_3X_2X_3$	0,7620	0,5837
Finesse	$b_0 + b_2 X_2 + b_4 X_4$	0,7393	0,6584
%>30µm	$b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_4X_4+b_1b_2X_1X_2$	0,6316	0,5331

Les tests statistiques réalisés sur les modèles mathématiques de la finesse et du pourcentage de fibres dont le diamètre est supérieur à $30\mu m$ sont bons (proches de 1), ceux du jaune restent corrects.

Pour affiner les meures d'impacts des différents facteurs sur le feutrage, nous avons décidé de poursuivre l'étude en réalisant une matrice d'expériences composite complémentaire au plan d'expériences déjà réalisé.

3.2.2. Optimisation par plan d'expérience composite centré

Les modèles mathématiques obtenus sont des polynômes de degré deux qui permettent la recherche d'optimum. Dans le cas présent, la méthode des plans d'expériences composites centrés est particulièrement bien adaptée. En effet, ce type de plan est réalisé sur la base des résultats obtenus avec le plan d'expérience factoriel complet 2^4 précédent. Ces expériences doivent être complétées par une ou plusieurs expériences au centre du domaine expérimental quand $X_i=0$ ($U_1^{\text{centre}}=2\text{mM}$, $U_2^{\text{centre}}=100\mu l/l$, $U_3^{\text{centre}}=0,125\text{M}$, $U_5^{\text{centre}}=62\text{g}$ d'O₃/m³) et d'une matrice d'expériences constituée par un ensemble de points situés sur les axes de chacun des facteurs X_1 à X_4 (Goupy, 1996 ; Chakchouk et coll., 1994). Cette matrice d'expériences et les résultats sont regroupés dans le tableau 31 :

Tableau 31 : Matrice d'expériences du plan composite centré et résultats obtenus à chaque expérience : les expériences 1 à 16 ont été réalisées précédemment dans le plan factoriel complet 2⁴. Les expériences 17 à 24 (en gras) viennent compléter ce plan pour former la matrice d'expériences composite centrée. L'expérience 25 (en gras) correspond à une mesure moyenne au centre du domaine obtenue par 4 essais.

1

Deve áriança	Ī	Facteu	ır (X _i)				Réponse (onse (Y)		
Experience	v	v.	v.	v.	Blancheur	Jaune	Finesse	%>30µm	Feutrage	
		A2	Δ3	<u> </u>	(W)		(µm)	(%)	(g/cm ³)	
	-1	-1	-1	-1	44,4	13,7	21,6	5,8	0,150	
2	1	-1	-1	-1	43,8	11,4	21,6	5	0,142	
3	-1	1	-1	-1	44,5	13,3	21,4	4,7	0,123	
4	1	1	-1	-1	43,7	12,2	21,5	4,6	0,131	
5	-1	-1	1	-1	40,2	11,7	21,5	5,6	0,126	
6	1	-1	1	-1	41,2	11,75	21,6	4,9	0,118	
7	-1	1	1	-1	41,2	11,1	21,4	4,8	0,096	
8	1	1	1	-1	40,7	10,2	21,5	5,6	0,094	
9	-1	-1	-1	1	44,7	12,3	21,5	4,6	0,050	
10	1	-1	-1	1	43,4	12,3	21,2	4,7	0,050	
11	-1	1	-1	1	42,6	13,2	21,0	4,5	0,050	
12	1	1	-1	1	41,8	11,8	20,4	4,2	0,050	
13	-1	-1	1	1	42,0	13,0	21,4	5,2	0,050	
14	1	-1	1	1	42,7	12,6	21,0	4	0,050	
15	-1	1	1	1	38,3	10,8	20,7	4,5	0,050	
16	1	1	1	1	39,5	10,7	20,5	4,2	0,050	
17	-1	0	0	0	41,2	11,9	21,0	4,6	0,050	
18	1	0	0	0	41,4	11,8	20,7	4,1	0,050	
19	0	-1	0	0	43,4	13,5	21,4	4,7	0,056	
20	0	1	0	0	41,9	12,2	20,9	4,7	0,050	
21	0	0	-1	0	44,3	13,5	21,1	4,7	0,050	
22	0	0	1	0	40,7	11,7	21,6	5,6	0,050	
23	0	0	0	-1	40,9	11,2	21,4	4,9	0,075	
24	0	0	0	1	39,8	10,6	20,0	3,2	0,050	
25	0	0	0	0	42,6	12,7	21,1	4,6	0,052	

Les valeurs des effets directs, d'interaction et de deuxième degré peuvent être obtenue par calcul matriciel en utilisant la relation suivante :

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^{\mathsf{t}}.\mathbf{X})^{-1}.\mathbf{X}^{\mathsf{t}}.\mathbf{Y}$$

Avec : X la matrice d'expériences ; X^t la matrice d'expériences transposée, Y la matrice des réponses et $(X^t.X)^{-1}$ l'inverse de la matrice du produit matriciel de X^t par X.

Cette opération relativement fastidieuse si elle est réalisée manuellement est résolue par ordinateur. Les valeurs des effets des facteurs principaux et de leurs interactions ainsi que des effets de deuxième degré ont été reportées tableau 32.

<u>**Tableau 32</u>** : Effets des facteurs principaux et de leurs interactions et effet de deuxième degré pour chaque réponse mesurée.</u>

D.C.A.	Blancheur	Jaune	Finesse	%>30µm	Feutrage
Effets	W		(µm)	(µm)	(g/cm^3)
bl	$-0,1\pm0,2$	-0,3±0,2	-0,1±0,1	-0,2±0,1	-0,001±0,004
b ₂	-0,6±0,2	-0,4±0,2	$-0,2{\pm}0,1$	-0,2±0,1	-0,005±0,004
b3	-1,5±0,2	-0,6±0,2	$-0,0\pm0,1$	0,1±0,1	-0,006±0,004
b4	-0,3±0,2	0,0±0,2	-0,3±0,1	-0,4±0,1	-0,034±0,004
b ₁₁	$-0,2\pm0,2$	-0,2±0,2	-0,1±0,1	-0,1±0,1	0,007±0,004
b ₁₂	$-0,0\pm0,2$	-0,0±0,2	0,0±0,1	0,2±0,1	0,001±0,004
b ₁₃	0,4±0,2	0,2±0,2	0,0±0,1	0,0±0,1	-0,001±0,004
b ₁₄	0,0±0,2	0,1±0,2	-0,1±0,1	-0,1±0,1	0,001±0,004
b ₂₂	1,1±0,2	0,8±0,2	0,2±0,1	0,2±0,1	0,010±0,004
b ₂₃	-0,2±0,2	-0,4±0,2	0,0±0,1	0,1±0,1	-0,001±0,004
b ₂₄	-0,7±0,2	-0,1±0,2	-0,1±0,1	$0,0\pm 0,1$	$0,006\pm0,004$
b ₃₃	1,0±0,2	0,5±0,2	0,4±0,1	0,7±0,1	0,007±0,004
b ₃₄	0,2±0,2	0,2±0,2	-0,0±0,1	-0,1±0,1	0,007±0,004
b ₄₄	-1,2±0,2	$-1,2\pm0,2$	-0,2±0,1	-0,4±0,1	0,019±0,004
b ₁₂₃	-0,1±0,2	-0,0±0,2	0,0±0,1	0,1±0,1	-0,001±0,004
b ₁₂₄	0,2±0,2	-0,1±0,2	-0,0±0,1	-0,1±0,1	-0,001±0,004
b ₁₃₄	0,1±0,2	-0,1±0,2	0,0±0,1	-0,1±0,1	0,001±0,004
b ₂₃₄	-0,2±0,2	$-0,1\pm0,2$	0,0±0,1	-0,1±0,1	0,001±0,004
b ₁₂₃₄	0,1±0,2	0,2±0,2	0,0±0,1	0,0±0,1	0,001±0,004

Le modèle mathématique obtenu par le plan d'expériences composite centré est un polynôme du deuxième degré par rapport à chacune des variables codées prises indépendamment. Les coefficients du polynôme sont la moyenne, les effets principaux et les effets d'interactions ainsi que les effets de degré deux. En théorie, pour un plan composite centré réalisé sur 4 facteurs, la réponse calculée η prend la forme suivante :

$$\eta = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{44} X_4^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{14} X_1 X_4 + b_{23} X_2 X_3 + b_{24} X_2 X_4 + b_{34} X_3 X_4 + b_{123} X_1 X_2 X_3 + b_{124} X_1 X_2 X_4 + b_{134} X_1 X_3 X_4 + b_{234} X_2 X_3 X_4 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 + b_{124} X_1 X_2 X_4 + b_{134} X_1 X_3 X_4 + b_{234} X_2 X_3 X_4 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 + b_{124} X_1 X_2 X_4 + b_{134} X_1 X_3 X_4 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 + b_{124} X_1 X_2 X_4 + b_{134} X_1 X_3 X_4 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 + b_{124} X_1 X_2 X_4 + b_{134} X_1 X_3 X_4 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 + b_{124} X_1 X_2 X_4 + b_{134} X_1 X_3 X_4 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 + b_{124} X_1 X_2 X_4 + b_{134} X_1 X_3 X_4 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 + b_{124} X_1 X_2 X_4 + b_{134} X_1 X_3 X_4 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 + b_{124} X_1 X_2 X_4 + b_{134} X_1 X_3 X_4 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 + b_{124} X_1 X_2 X_4 + b_{134} X_1 X_3 X_4 + b_{1234} X_1 X_2 X_3 + b_{1234} X_1 X_2 + b_{1234} X_1 + b_$$

Comme dans le cas du plan factoriel 2^4 , cette équation théorique est simplifiée en pratique en éliminant les effets non influants de manière à maximiser les valeurs de r² et P_{χ}². Les résultats obtenus ont été reportés dans le tableau 33 :

<u>**Tableau 33**</u> : Formulation et évaluation statistique des modèles mathématiques retenus pour chaque réponse.

Réponses à estimer Y:	Modèle mathématique	Test sta r ²	tistique P_{r}^{2}
Blancheur	$\frac{b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{44}}{X_4^2 + b_1 b_3 X_1 X_3 + b_2 b_4 X_2 X_4}$	0,6782	0,8896
Jaune	$b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_4+b_{22}X_2^2+b_{33}X_3^2+b_{44}X_4^2+b_1b_3X_1X_3+b_2b_3X_2X_3$	0,7515	0,3502
Finesse	$b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_4+b_{22}X_2^2+b_{33}X_3^2+b_{44}X_4^2+b_1b_4X_1X_4+b_2b_4X_2X_4+b_3b_4X_3X_4$	0,3885	0,6039
%>30µm	$\frac{b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_4+b_{11}X_1^2+b_{22}X_2^2+b_{33}}{X_3^2+b_{44}X_4^2+b_{1b}_2X_1X_2+b_{1b}X_1X_4+b_{2b}_3X_2X_3}$	0,3837	0,5913
Feutrage	$b_0+b_2X_2+b_4X_4+b_{22}X_2^2+b_{44}X_4^2$	0,8584	0,8339

Les coefficients r^2 et P_{χ}^2 des polynômes du deuxième degré obtenus pour la blancheur, le degré de jaune, la finesse et le pourcentage de fibres de diamètre supérieur à 30µm sont inférieurs ou égaux à ceux obtenus par les polynômes plus simples du 1^{er} degré qui avaient été retenus dans le tableau 30. Nous avons donc utilisé ces polynômes pour réaliser les courbes d'isoréponses correspondantes (figure 48).



figure 48 : Courbes d'isoréponses de la blancheur, du degré de jaune, de la finesse et du pourcentage de fibres dont le diamètres est supérieur à $30\mu m$ et du feutrage en fonction des facteurs les plus influents. Les polynômes du premier degré utilisés pour modéliser ces réponses sont présentés dans le tableau 30.

Ces courbes illustrent bien l'évolution de la blancheur et du degré de jaune en fonction de la concentration de la préparation enzymatique de *GC 897* et du peroxyde d'hydrogène. La finesse et le pourcentage de fibres dont le diamètre est supérieur à 30µm sont des caractéristiques améliorées par le traitement d'oxydation à l'ozone suivi de l'attaque enzymatique.

Dans le cas du feutrage, le polynôme du deuxième degré obtenu par le plan composite présente une excellente corrélation avec les résultats expérimentaux. Le graphique de la figure 49 illustre l'influence de l'ozone et de la préparation de subtilisine sur la diminution du feutrage.



figure 49 : Courbes d'isoréponses de l'aptitude au feutrage en fonction de la concentration en ozone et en *GC 897*. Cette modélisation est réalisée en utilisant le polynôme du deuxième degré du tableau 33.

Cette courbe montre bien l'impact très important de la concentration de l'ozone sur la diminution de l'aptitude au feutrage des fibres. Par contre l'influence de l'enzyme sur cette réponse est beaucoup plus restreinte. L'optimum de concentration de *GC 897* modélisé par le polynôme est d'environ 100µl/l. Cette valeur est liée aux influences positives directes de b_2 = - 0,005±0,004g/cm³ et négatives du coefficient de deuxième degré b_{22} =0,010±0,004g/cm³.

En résumé : Le traitement infeutrable des fibres de laine par oxydation à l'ozone et protéolyse enzymatique apparaît comme une solution intéressante. Parmi les différents facteurs étudiés, l'effet de la concentration en ozone sur la diminution du feutrage se détache largement. Le polynôme du deuxième degré obtenu pour ce facteur permet une modélisation très efficace de l'évolution du feutrage en fonction de la concentration en ozone et en enzyme. Pour les autres réponses, les meilleurs modélisations ont été obtenues par les polynômes du premier degré issues du plan factoriel complet 2⁴. Outre l'amélioration globale des caractéristiques colorimétriques et de l'absence de détérioration des fibres par le traitement, la diminution de leur diamètre moyen est une évolution très intéressante qui en augmente la valeur marchande.

4. Caractérisation des fibres de laine traitées par un procédé d'oxydation par l'ozone suivi d'une hydrolyse enzymatique ménagée

A ce stade de l'étude, une caractérisation exhaustive du produit obtenu par le procédé d'oxydation par l'ozone suivie d'une protéolyse ménagée a été entreprise. Ainsi, une série de mesures sur la couleur, la dimension, la résistance, le feutrage, le taux d'acide 18-méthyleicosanoïque et l'observation en microscopie électronique des fibres ont été réalisées aux différentes étapes du traitement. En complément, le caractère irrétrécissable du produit a également été testé. Les trois échantillons correspondants aux différentes étapes du procédé sont :

- un échantillon témoin de fibre brute peignée cardée.
- un échantillon traité par l'ozone : 10,00±0,05g de fibres sont traitées 15 minutes par 2l/min d'oxygène contenant 100gO₃/m³.
- un échantillon traité par l'ozone et la préparation enzymatique de GC 897: 10,00±0,05g de fibres sont traitées 15 minutes par 2l/min d'oxygène contenant 100gO₃/m³. Ces fibres sont placées 5 minutes dans 1 litre de tampon borate pH 9,2/0,25M/55°C contenant 200µl/l de GC 897. L'échantillon est neutralisé 2 minutes par 1 litre de solution d'H₂SO₄ à pH=2.

Au regard du plan d'expériences réalisé précédemment, ces traitements apparaissent drastiques mais l'objectif est de mettre très nettement en évidence les qualités et défauts du procédé. Les caractéristiques dimensionnelles et colorimétriques des échantillons sont reportées dans le tableau 34 :

<u>**Tableau 34</u>**: Caractéristiques colorimétriques et dimensionnelles des fibres brutes, oxydées par l'ozone et traitées par *GC 897*.</u>

	Blancheur W	Jaune	Finesse (µm)	%>30µm (%)	Feutrage (g/cm ³)	Ténacité (cN/Tex)
Fibre brute peignée cardée	49,4	12,7	21,3	4,3	0,188	8,60
Fibre oxydée par l'ozone	46,0	12,3	21,2	4,3	≤0,050	-
Fibre oxydé par l'ozone et hydrolysé par les protéases	44,5	11,6	18,2	1,8	≤0,050	7,98

Globalement, le traitement améliore la blancheur des fibres (W : 49,4 \rightarrow 44,5). Comme cela a été démontré précédemment, cet effet est lié à la fois à l'ozone et au traitement enzymatique. Parallèlement nous observons une légère diminution du degré de jaune (Jaune : 12,7 \rightarrow 11,6) liée au traitement enzymatique. Ces résultats doivent toutefois être interprétés avec prudence car une évolution colorimétrique des fibres dans le temps est envisageable. Cette éventualité est un phénomène classique qui n'a toutefois pas été étudié dans ces travaux.

Les mesures de finesse réalisées sur l'échantillon traité ozone/GC 897 évoluent significativement. Le diamètre moyen de ces fibres chute de $3.1\mu m$ par rapport au témoin non traité. Cet effet s'accompagne naturellement d'une perte de matière symptomatique dont les répercussions sur le coût ne peuvent être négligées. Toutefois, cette modification qui n'entraîne pas de diminution dramatique de la résistance des fibres (%>30 μm : 4,3 \rightarrow 1,8%; ténacité : 8,60 \rightarrow 7,98cN/Tex) peut être commercialement intéressante si l'on se réfère à la courbe de prix des fibres en fonction de leur finesse (figure 50) :



Figure 50: Evolution du prix des fibres de laine en fonction du diamètre (source CHARGEURS WOOL).

Le gain généré par l'achat d'une fibre de 21µm transformée en fibre de 18µm est de 47FF/Kg soit une plus value de 147%. Ce chiffre ne tient évidemment pas compte des pertes de matières qui peuvent correspondrent à environ 25%, du coût du traitement, de l'investissement en matériel et du profit obtenu par l'acquisition du caractère d'irrétrécissabilité. En pratique, il serait sans doute plus intéressant de travailler sur une fibre

de départ plus fine de manière à réaliser un traitement moins sévère. Dans ce cas, la diminution de la finesse des fibres serait bien sur minimisée mais les pertes de matière également.

L'observation directe des échantillons de laine aux différents stades du traitement illustre parfaitement les modifications localisées à la surface des fibres (figure 51).



③ :Fibre oxydée par l'ozone et hydrolysée par les protéases du GC 897



Figure 51: Observation au microscope électronique à balayage des modifications de surface occasionnées par le traitement d'oxydation à l'ozone et l'hydrolyse enzymatique par *GC 897* (grossissement : $2000 \times$ pour \oplus , @ et \circledast b et $600 \times$ pour \circledast a).

Ces photographies illustrent parfaitement les modifications occasionnées par le traitement à ces différentes étapes. Au départ, les écailles de cuticule responsables du feutrage sont bien

visibles (figure 51 ①). Après oxydation par l'ozone, la fibre subit un premier ponçage qui affecte les arêtes des écailles initialement saillantes (figure 51 ②). L'hydrolyse enzymatique des fibres oxydées par l'ozone entraîne le retrait total de l'écaille de cuticule (figure 51 ③). Ce phénomène traduit bien la diminution du diamètre moyen des fibres ainsi que celle du taux de 18-méthyleicosanoate (tableau 35).

<u>Tableau 35</u> : Evolution de la quantité de 18-méthyleicosanate des fibres aux différents stades du traitement irrétrécissable.

Echantillon	Taux de 18-méthyleicosanoate (mg/g de fibre)	% relatif de 18-méthyleicosanoate perdu
Fibre brute	1,010±0,06	0%
Fibre oxydée pat l'ozone	0,702±0,06	30%
Fibre brute traitée par les protéases	0,953±0,06	0%
Fibre oxydée par l'ozone et traitée par les protéases	0,367±0,06	64%

Le taux de 18-méthyleicosanoate présent à la surface des fibres est fortement affecté par le traitement oxydatif par l'ozone. Cette tendance (perte = 30%) est comparable avec la perte (=38%) mesuré dans le cas de l'oxydation par le chlore (tableau 12). De manière similaire l'attaque enzymatique de la surface des fibres n'est effective uniquement après l'oxydation par l'ozone (taux : $0\% \rightarrow 64\%$).

A ce stade l'irrétrécissabilité de l'échantillon peut être attendue. Cette caractéristique a été étudiée.

Cette expérience a été réalisée sur des pièces de tissus tricotées d'environ 100g de fibres. La matière a été préalablement oxydée par tronçons de $10,00\pm0,05g$ dans l'oxygène contenant $100gO_3/m^3$ à raison de 2l/min pendant 15 minutes. Les fibres ont été hydrolysées 5 minutes par 10 litres d'une solution de *GC 897* à $0,2\mu$ l/l dans du tampon borate 0,25M à pH=9 et à 55°C.

L'échantillon non traité présente un retrait total à l'issue du test de +80% comparable à celui obtenu dans le cas du test des fibres chlorées. Dans les mêmes conditions, l'échantillon traité par l'ozone et soumis à l'hydrolyse enzymatique présente un retrait de seulement -4%. Ce relâchement de l'étoffe peut être compensé mécaniquement au moment de la filature et du tricotage. A la taille de l'échantillonnage près, ces résultats encourageants permettent de

revendiquer le label lavable machine pour tous les articles en laine. Il sera donc nécessaire de produire une plus grande quantité de matière pour valider définitivement le test machine. Cette opération passe par la construction et la mise en œuvre d'un réacteur de traitement des fibres à l'échelle pilote.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette étude proposée par le groupe CHARGEUR était l'obtention et l'optimisation d'un traitement infeutrable et écologique des fibres de laine par voie enzymatique. Le feutrage des fibres est en effet directement responsable du rétrécissement néfaste des étoffes de laine au cours du lavage. Les orientations scientifiques développées dans ces travaux ont été fortement inféodées au contexte industriel sous jacent. Ainsi, le choix des enzymes utilisées a répondu à la double exigence imposée par la nature essentiellement protéique des fibres (\approx 97%) et la volonté industrielle d'insérer le traitement après l'étape de lavage dans la chaîne de production continue de laine peignée. En tenant compte des conditions physico-chimiques observées à l'issue de l'étape de lavage le choix des enzymes a été arrêté aux protéases alcalines industrielles *GC* 897 commercialisées par GENENCOR.

Nous avons montré que l'attaque enzymatique de la surface des fibres n'était réalisable qu'après oxydation par une solution chlorée. Cet agent chimique, bien que très polluant, a été initialement utilisé en raison de sont efficacité oxydante notoire vis à vis des fibres de laine. La mesure systématique du caractère irrétrécissable des étoffes de laine traitée est une opération coûteuse, longue et fastidieuse. L'évaluation de l'efficacité des traitements sur le critère irrétrécissable n'a donc pas été réalisée en première approche. De plus, au niveau industriel, la qualité globale des fibres de laine dépend non seulement de la résistance au feutrage qui est un bon indicateur de l'irrétrécissabilité mais également de nombreux autres facteurs tels que la couleur, la finesse ou encore la résistance à l'étirement. Une analyse multifactorielle de ces caractéristiques par les outils spécifiques de l'industrie textile a donc été réalisée.

Les observations directes par microscopie électronique à balayage montrent des fibres dont la surface est toute ou partie poncée. L'élimination d'une fraction de cette surface correspondant à une partie de la cuticule diminue de manière très importante l'aptitude au feutrage des échantillons jusqu'à leur limite inférieure de mesure sans pour autant affecter l'intégrité des fibres. Parallèlement nous avons noté une amélioration notable des caractéristiques colorimétrique après oxydation et protéolyse.

En complément, nous avons entrepris à différentes étapes des traitements oxydatifs et enzymatiques l'analyse fine des variations du taux d'un marqueur biochimique présent spécifiquement à la surface des fibres. Dans cet objectif, l'acide 18-méthyleicosanoïque (MEA) ramifié en antépénultième position par un résidu méthyle et exclusivement lié par des liaisons thioester à la cuticule, constituait un marqueur de prédilection. Après saponification et extraction de l'ensemble des acides gras liés aux fibres, deux techniques de dérivation complémentaires ont été utilisées lors de l'identification de ce composé par CG-MS. Dans une première étape, la technique classique de dérivation sous forme d'ester de méthyle fut mise en œuvre puis complétée par une dérivation sous forme de dérivé N-acyl pyrrolidide. Cette dernière méthode étant particulièrement adaptée à l'analyse fine des acides gras à longue chaîne carbonée. Les mesures du taux de cet acide gras après le traitement par le chlore indiquent une modification profonde de l'épicuticule caractérisée par la diminution de 28% (g/g) du taux de MEA. L'efficacité de l'attaque protéolytique des fibres après oxydation est une conséquence directe de ces changements de surface. A l'issue de l'oxydation et de l'hydrolyse la perte totale en MEA atteint ainsi un maximum de 56%.

Les échantillons d'étoffe réalisés à partir de fibres traitées par le chlore et attaquées par les subtilisines ont été soumis au test normé de lavage en machine. Aucun retrait n'à pu être mesuré sur ces échantillons, alors qu'un rétrécissement de prés de 80% à été constaté sur un témoin non traité. De plus, la dénaturation en milieu acide des protéases adsorbées aux fibres après traitement a également été mise au point de manière à éviter d'éventuelles hydrolyses non contrôlées.

Bien qu'ayant démontré son éfficacité, l'utilisation du chlore en tant qu'agent d'oxydation dans un procédé qui se veut avant tout écologique a été remise en cause. Les travaux se sont naturellement orientés vers la recherche d'agents oxydants alternatifs au chlore. Trois candidats ont été testés : les systèmes combinant le peroxyde d'hydrogène avec des ions métalliques ou d'oxyde métallique (WoO_4^{2-} , MO_4^{2-} , Ca^{2+} , Fe^{2+}), l'acide performique et l'ozone. Les résultats de ces investigations basées sur les mesures de sensibilité à l'attaque par les protéases et sur les mesures obtenues par des outils de l'industrie lainière (couleur, finesse...) ont permis de retenir ces deux derniers traitements.

Une optimisation de ces traitements oxydatifs suivis d'une attaque enzymatique a été menée par la technique des plans d'expériences. Dans le cas du traitement à base d'acide performique, l'influence de la température de la solution enzymatique, de la concentration de l'acide performique, ainsi que de sa température et de sa durée d'application ont été mesurées par un plan d'expériences factoriel complet 2⁴. Le résultat de cette étude montre que tous les facteurs testés à l'exception de la durée de l'oxydation, diminuent l'aptitude au feutrage mais altèrent considérablement la résistance des fibres. Pour tenter de résoudre ce problème, l'optimisation de la concentration et de la température d'application de la solution d'acide performique a été réalisée par la méthode séquentielle du Simplex, sans pour autant parvenir à une solution probante. La feutrage ne pouvant être diminuée suffisamment sans réduction inacceptable de la ténacité, le traitement à base d'acide performique a finalement été abandonné.

L'optimisation du traitement infeutrable par oxydation à l'ozone suivie de l'hydrolyse par les protéases du GC 897 a été entreprise. Dans un premier temps, un plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux 2^4 a permis de définir l'influence de la concentration de l'ozone, des enzymes, de la soude et du peroxyde d'hydrogène. L'effet de ces facteurs sur la couleur et la finesse des fibres a été modélisé par un polynôme du premier degré. Par contre l'importance de l'augmentation de la concentration en ozone sur la diminution du feutrage est telle qu'elle n'a pu être quantifiée très précisément. Un plan d'expériences centré réduit, complémentaire au plan 2^4 réalisé précédemment a permis d'obtenir un modèle polynomial de degré deux modélisant convenablement le feutrage en fonction des différents facteurs, notamment de la concentration en ozone.

Dans le dernier chapitre nous avons testé exhaustivement les caractéristiques d'échantillons oxydés de manière intensive par l'ozone puis soumis à l'attaque protéolytique. Le caractère irrétrécissable du produit final suggéré par l'absence de feutrage a été démontré par le test normé de lavage en machine. Par ailleurs, les mesures colorimétriques montrent également une amélioration sensible de ces caractéristiques. En parallèle il a été observé une forte diminution de la finesse des fibres sans altération de leurs résistances. Cette dernière mesure, complémentaire avec celle de la chute du taux de 18-méthyleicosanoate (perte 64%) et les observations par microscopie de fibres parfaitement lisses suggèrent que les modifications se limitent comme dans le cas du chlore à la surface des fibres. Sur le plan économique, la plus value engendrée uniquement par la réduction du diamètre moyen des fibres a été estimée en première approche à environ 147%.

A ce stade de l'étude rappelons que les conditions opératoires du traitement, notamment de l'oxydation par l'ozone, sont très éloignées de celles pouvant être pratiquées dans l'industrie. De plus d'autres questions restent en suspend comme par exemple l'éventuel recyclage des enzymes adsorbées aux fibres de laines et l'évaluation de l'épuisements des bains d'enzyme dans le cas d'un passage continue de fibres. Il est donc nécessaire de réaliser un réacteur à l'échelle pilote pour confirmer ces premiers résultats, évaluer une éventuelle faisabilité technologique dans le cadre d'un procédé industriel continu et approcher plus finement un bilan économique. De plus ce procédé de traitement irrétrécissable entraîne l'élimination d'une partie importante des écailles de cuticule. Or, cette structure extrêmement riche en résidus soufrés (35% de cys) constitue un sous produit dont la valorisation devrait être envisagée. Enfin, sur la base générale de ce traitement oxydatif à l'ozone, l'application d'autres enzymes telles que des cellulases peut aussi être envisagée pour éliminer les traces de matière végétale présentes au niveau des fibres. Ces résidus cellulosiques imposent en effet l'utilisation de nombreuses cardes qui alourdissent la chaîne de production de laine lavée et causent la perte d'une partie non négligeable de fibre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allwörden V.K. Die Eigenschaften der Schafwolle und eine neue Untersuchungsmethode zum Nachweis geschädigter wolle auf chemischem Wege. *Angew. Chem.* **29(17)** : 71 (1916).
- Anderson C.A., Goldsmith M.T., Katz H.J., Wood G.F. The roles of chlorine treatment and resin application in the CSIRO Chlorine/Resin shrinkproofing process. *Appl. Poly. Sym.* 18: 715-725 (1971).
- Aubry J.M. Search for singlet oxygen in the decomposition of hydrogen peroxide by mineral compounds in aqueous solutions. J. Am. Chem. Soc. 107 : 5844-5849 (1985).
- Bals O., Porte C., Delacroix A. Optimisation, par Simplex, de profils de température pour les cristallisations batch. Application à l'acide α -Dgalacturonique. *Anal.* **24** : 294-298 (1996).
- Barnathan G., Kornprobst J.M., Doumenq P., Mirallès J. New unsaturated long-chain fatty acids in the phospholipids from the Axinellida sponges *Trikentrion loeve* and *Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*. *Lipids* **31(2)** : 193-200 (1996).
- Birbeck M.S.C., Mercer E.H. The electron microscopy of the human hair follicle. Part 1. Introduction and the hair cortex *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3(2)** : 203-215 (1957).
- Bradbury J.H., King N.L.P. The chemical composition of wool : IV The quantity of each histological component. *Aust. J. Chem.* **20** : 2803-2807 (1967).
- Bradbury J.H., Leeder J.D. Keratin fibres. Aust. J. Biol. Sci. 23: 843-854 (1970).
- Bradbury J.H. Application of the descaling technique to the theory of shrinkproofing of wool. *J. Text. Inst.* **51** : T1226-T1236 (1960).
- Bradbury J.H. The theory of shrinkproofing of wool. Part II : Chemical modification of the fiber surface and its effect on felting shrinkage, friction, and microscopic appearance. *Text. Res. J.* **31** : 735-743 (1961).
- Bradbury J.H. The structure and chemistry of keratin fibers. *Adv. Prot. Chem.* 27 : 111-211 (1973).
- Bradbury J.H., Ley K.F. The chemical composition of wool: XI. Separation and analysis of exocuticle and endocuticle. *Aust. J. Biol. Sci.* **25** : 1235-1247 (1972).
- Bradlhey R.H. Clackson I.L., Syckes D.E. U.V. ozone modification of wool fibre surfaces. *Appl. Surf. Poly.* **72** : 143-147 (1993).
- Brown T.D., Onions W.L. Anomalies in the microscopic structure of some wools. *Nature* (London). **186** : 93-94 (1960).
- Bryson W.G., Herbert B.R., Rankin D.A., Krsinic G.L. Characterisation of proteins obtained from papain/dithiothreitol digestion of Merino and Romney wools. *Proc.* 9th int. Wool Text. Res. Conf., Biella. II : 436-473 (1995).

• Chakchouk M., Puech-Costes E., Foussard J.N., Debellefontaine H. Oxydation humide des polluants organiques par l'oxygène moléculaire activée par le couple H_2O_2/Fe^{2+} : Optimisation des paramètres opératoires. *Rev. Sci. de l'Eau* 7(4) : 405-425 (1994).

• Clement J.L., Hagege R., Gastoldi, Le Pareux A. Some aspects of the morphology of keratin fibers medulla. *Proc.* 6th Int. Wool Tex. Res. Conf., Pretoria. **II** : 113-146 (1988).

• Collins S., Davidson R.S. Aspects of the photochemistry of wool yolk (wool wax and suint). *Rev. Prog. Col.* **27** : 42-57 (1997).

• Delacroix A., Porte C. Méthodes d'optimisation en chimie analytique. *Techniques de l'ingénieur* (**P225**): 1-22 (1996A).

• Delacroix A., Porte C. Utilisation de plans d'expériences associés à des méthodes directes pour l'optimisation en cimiométrie. *Anal. Mag.* **24(1)** : M22-M25 (1996B).

• Dowling L.M., Sparrow L.G. Sequences of wool keratin proteins : the CSIRO connection. *Tre. Biochem. Sc.* **16(3)** : 115-118 (1991).

• Dybdal L., Heine E., Höcker H. A method for enzymatic treatment of wool. Brevet WO 96/19611 (1996).

• Dyck G.E. Process of curing hair. Brevet US 957316 (1910).

• Evans D.J., Lanczki M. Cleavage of integral surface lipids of wool by aminolysis. *Text. Res. J.* 67(6): 435-444 (1997).

• Evans D.J., Leeder J.D., Rippon J.A., Rivett D.E. Separation and analysis of the surface wool fiber. *Proc.* 7th Int. Wool Text. Res. Conf., Tokyo. I: 135-142 (1985).

• Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **10** : 497-509 (1957).

• Gilleßen B., Thomas H., Kaufmann R., Höcker H. Modification of wool by irradiation with electron beams. *Proc.* 9th Int. Wool Text. Res. Conf., Biella. II : 259-264 (1995).

• Goupy J. La méthode des plans d'expériences. ed. DUNOD (1988).

• Goupy J. Plans d'expériences. Techniques de l'ingénieur (P230) : 1-24 (1996)

• Heine E., Höcker H. Enzyme treatments for wool and cotton. *Rev. Prog. Colo.* **25** : 57-63 (1995).

• Hirs C.H.W. Performic Acid Oxidation. *Methods in Enzymology : Enzyme Structure* XI : 197-199 (1967).

• Hirs C.H.W. The oxidation of ribonuclease with performic acid. J. Biol. Chem. 219 : 611-621 (1956).

• Huson M.G., Phillips T.L., Turner P.S. Studies of surface structure and cuticle swelling of wool fibers using scanning force microscopy. *Int. Wool Text. Org., Harrogate.* **9** : 1-12 (1995).

• Kalkbrenner U., Körner A., Köcker H., Rivett D.E. Studies on the lipid composition of the wool cuticle. *Proc.* 8th Int. Wool Text. Res. Conf., Christchurch. I : 398-407 (1990).

• Kan C.W., Chan K., Yuen C.W.M. Effect of low temperature plasma, chlorination and polymer treatments and their combinations on the properties of wool fibers. *Text. Res. J.* **68(11)** : 814-820 (1998).

• Khan A.U., Kasha M. Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution. J. Chem. Phys. **39(8)** : 2105-2106 (1963).

• King R.D., Brockway B.E. Treatment of wool materials. Brevet B 4834765 (1989).

• Klausen T., Thomas H., Höcker H. Influence of oxygen plasma treatment on the chemical and morphological changes of the wool fibre surface. *Proc.* 9th Int. Wool Text. Res., Biella. II : 241-248 (1995).

• Kulkarni V.G., Robson R.M., Robson A. Studies on the orthocortex and paracortex of merino wool. *Appl. Pol. Sym.* 18: 127-146 (1971).

• Lantéri P., Accary A., Phan Tan Luu R., Longeray R. Réaction de dicycloadition des orthodihydroxyméthyldiphénols : II. Recherche des conditions optimales de la synthèse de tétrahydrobenzodipyrannes. Etude dans le cas de la dihydroxyméthyl-2,5hydroquinone réagissant sur le styrène en présence de BF₃ (éthérate). *Bull. Soc. Chim. France* : (11-12) : II-415 à II-419 (1981).

• Leeder J.D. The Cell membrane Complex and its Influence on the properties of the wool Fibre. *Wool Sci. Rev.* **63** : 3-35 (1986).

• Lofts P.F., Truter E.V. The constitution of the epicuticle of wool. J. Text. Inst. 60: 46-56 (1969).

• Makinson R. « Shrinkproofing of wool », New York, ed. MARCEL DEKKER (1979).

• Martin A.J.P. Observations on the theory of felting. J. Soc. Dye. Col. 60(12) : 326-328 (1944).

• Mirallès J., Barnathan G., Galonnier R., Sall T., Samb A., Gaydou E.M., Kornprobst J.M. New branched-chain fatty acids from the Senegalese Gorgonian *Leptogorgia piccola* (white and yellow morphs). *Lipids* **30(5)** : 459-466 (1995).

• Moncrieff R.W. Wool shrinkage and its prevention. *The national trade press LHd London U.K.* (1953).

• Morrison W.R., Smith L.M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetal from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lip. Res.* **5** : 600-608 (1964).

• Nayme C. Etude de la dégradation par ozonation de deux colorants utilisés en teinture. Thèse n° 1673. Université de Rennes 1 (1997).

• Negri A.P., Cornell H.J., Rivett D.E. A model for the surface of keratin fibres. *Text. Res. J.* **63(2)** : 109-115 (1993).

• Negri A.P., Cornell H.J., Rivett D.E. Effects of processing on the bound and free fatty acid levels in wool. *Text. Res. J.* **62(7)** : 381-387 (1992).

• Negri A.P., Cornell H.J., Rivett D.E. The nature of covalently bound fatty acids in wool fibres. *Aust. J. Agric. Res.* **42** : 1285-1292 (1991).

• Norme IWTO 32-82(E) : Determination of the bundle strength of wool fibres. International Wool Secretariat, Raw Wool Services Departement, Valley Drive, Ilkley, Yorkshire LS29 8PB United Kingdom.

• Norme IWTO 12-95 : Measurement of the mean and distribution of diameter using the sirolan-Laserscan fibre diameter analyser. International Wool Secretariat, Commercial Development, Departement, Valley Drive, Ilkley, Yorkshire LS29 8PB United Kingdom.

• Norme IWTO 20-69(E) : Method for the determination of the felting properties of loose wool and top. Wool Secretariat, International Wool Marketing, Valley Drive, Ilkley, Yorkshire LS29 8PB United Kingdom.

• Norme IWTO 35-87(F): Méthode de mesure de la blancheur des rubans de laine. Wool Secretariat, International Wool Marketing, Valley Drive, Ilkley, Yorkshire LS29 8PB United Kingdom.

• Norme IWS TM 31 : Washing of wool textile products (relaxation and felting shrinkage).

• Otten H.G., Blankenburg G. Über die verfahren zur Antifilzausrüstung von wolle. Z Ges. Textilind. 64(6) : 503-509 (1962).

• Peet D.J., Wettenhall E.H., Rivett D.E., Allen A.K. A comparative study of covalentlybound fatty acids in keratinised tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* **102B(2)** : 363-366 (1992).

• Peters D.E, Bradbury J.H. The chemical composition of wool : X. Material digested by trypsin from fibres and cortical cells. *Aust. J. Biol. Sci.* **25** : 1225-1234 (1972).

• Phan K.H., Thomas H., Heine E. Structure of cuticle of fine wool fibre. *Proc.* 9th Int. Wool Text. Res. II : 19-30 (1995).

• Phillips H., Middlebrook W.R. Treatment of wool to diminish shrinkage. Brevet B 513919 (1938).

• Phillips H., Middlebrook W.R. Treatment of wool to diminish shrinkage. Brevet US 2322313 (1943).

• Powell B.C., Rogers G.E. The role of keratin proteins and their genes in the growth, structure of human hair. Ed Jolles P., Zahn H., Höcker H. *Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland* (1997).

- Rawlings N.D., Barrett A.S. Families of serine peptidases. Meth. In Enz. 244 : 19-40 (1994).
- Rivett D.E. Structural lipids of the wool fibre. Wool Sci. Rev. 67: 1-25 (1991).
- Rogers G.E. Electron Microscopy of wool. J. Ultrastr. Res. 2: 309-330 (1959A).
- Rogers G.E. Electron Microscopy studies of hair and wool. Ann. N. Y. Acad Sc. 83 : 378-399 (1959B).
- Röper K., Föhles J., Klostermeyer H. Complete enzymatic hydrolysis of wool and ist morphological components. *Meth. In Enz.* **106** : 58-59 (1984).
- Sarath G., De La Motte R.S., Wagner F.W. Protease assay methods. Proteolytic enzymes a practical approch ed. Beyon R.J. et Bond J.S. IRL PRESS/OXFORD UNIVERSITY PRESS. Pages : 25-55 (1989).
- Schäfer K., Goddinger D., Höcker H. Photodegradation of the amino acid tryptophan in wool. *IWTO Nice Meeting* 11 : 1-15 (1995).
- Schulte P., Bayer A., Kuhn F., Luyand Th., Volkmer M., Degussa A. H_2O_2/O_3 , $H_2O_2/U.V.$ and H_2O_2/Fe^{2+} processes for the oxidation of hazardous wastes. *O*₃ *Sci.* & *Eng.* **17** : 119-134 (1995).
- Shorter S.A. The moisture content of wool-its relation to scientific theory and commercial practice. *Amer. Dyes. Rep.* **5** : 797-803 (1923).
- Steiner M. Roop D.R. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Ann. Rev. Biochem.* **57** : 593-625 (1988).
- Thorsen W.J. Method of shrinkproofing animal fibre with ozone. Brevet US 4189303 (1980).
- Wagner L., Giesen M., Zhan H. Histochemical localization of high-sulfur keratins with silver nitrate. *Coll. Poly. Sci.* **261** : 365-369 (1983).
- Walsh C. Enzymatic reaction mechanisms. Ed. W.H. Freeman & Company, San Francisco. (1979).
- Ward R.J., Willis H.A., George G.A. Surface analysis of wool by X-ray photoelectron spectroscopy and static secondary ion mass spectroscopy. *Text. Res. J.* **63(6)** : 362-368 (1993).
- Wertz P.W., Downing D.T. Integral lipids of human hair. Lipids. 23(9): 878-881 (1988).

• Wertz W., Downing D.T. Integral lipids of mammalian hair. Comp. Biochem. Physiol. **92B(4)**: 759-761 (1989).

• Yu Q.T., Liu B.N., Zhang J.Y., Huang Z.H. Location of methyl branchings in fatty acids : fatty acids in uropygial secretion of shanghai duck by GC-MS of 4,4-Dimethyloxazoline derivatives. *Lipids.* **23(8)** : 804-810 (1988).

• Zahn H. The macrofibril of keratin fibres. *European Fine Fibre Network, Occassional Publication.* **4**: 3-13 (1996).

• Zeffren E., Hall I. The study of enzyme mecanisms. Ed. Jhon Wiley & Sons, Inc. (1973).

